



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Laura PIERINI

le lundi 28 septembre 2015

Titre :

Etude des mécanismes moléculaires impliquant l'ADN polymérase Kappa dans le checkpoint de phase S

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biotechnologies, Cancérologie

Unité de recherche :

INSERM U1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Marie-Jeanne PILLAIRE
Dr. Jean-Sébastien HOFFMANN

Jury :

Rapporteurs:

Dr. Agnès CORDONNIER
Dr. Daniel FISHER
Dr. Kathrin MARHEINEKE

Président du jury:

Pr. Estelle ESPINOS-PARROU

La chute n'est pas un échec. L'échec est de rester là où l'on est tombé.

Socrate

Remerciements

Je commencerai par remercier chaleureusement les **Dr. Agnès Cordonnier, Dr. Daniel Fisher, Dr. Kathrin Marheinke, et le Pr. Estelle Espinos-Parrou** pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Un grand merci aux sociétés **Beopan, Kleiberit, Lafarge, Placoplatre, Polyprod, et Sika** qui ont financé ma thèse via un mécénat d'entreprise. Merci de m'avoir offert la possibilité de continuer mes études. C'était la première fois que l'on voyait ce mode de financement à Toulouse, et j'espère que ce ne sera pas la dernière.

Merci aux **Dr. Florence Larminat et Dr. Patricia Kannouche**, qui ont fait parties de mon comité de thèse. Merci pour vos conseils, et vos idées qui m'ont permis d'avancer.

Je remercie **Dr. Jean-Sébastien Hoffmann** pour m'avoir accueillie dans l'équipe durant mon année de Master 2, mais également pour mon doctorat que tu as co-encadré. Merci pour ta disponibilité, et ton implication dans mon projet de recherche.

Je voudrais avoir une pensée pour le **Pr. Christophe Cazaux**. Il a été le premier à me parler d'instabilité génétique, d'ADN polymérase spécialisée, ou de réparation. J'avais beaucoup aimé ces cours, qui d'ailleurs m'ont donné envie de postuler en master 2 dans l'équipe. Un grand merci pour tout. Il va beaucoup nous manquer.

Un merci tout particulier au **Dr. Marie-Jeanne PILLAIRE**, ma co-directrice de thèse. Merci pour ton soutien indéfectible, ton engagement dans mon projet de recherche, et ta confiance. Tu as toujours cru en moi, et tu m'as toujours poussé vers le haut. Merci pour ta disponibilité pour parler d'un résultat, d'un protocole, du projet, mais aussi quand ça n'allait pas pour moi. J'ai eu beaucoup de chance de t'avoir eu comme encadrante. Tu m'as beaucoup appris !! Un très grand merci pour tout !

Merci au **Dr. Marlène Dufresnes** pour ces conseils sur les expériences d'ubiquitination, qui m'ont permis de commencer vite ce projet.

Merci à l'ensemble de l'équipe, pour cette ambiance chaleureuse, et l'entraide qui règne dans le labo. J'ai eu plaisir à travailler avec vous au cours de ces années.

Merci à **Valérie**, pour être toujours disponible pour discuter un résultat, un papier, un protocole, ou donner un conseil avisé. Merci à **Rémy**, toujours disponible pour donner des idées ou un protocole. Un grand merci aux thésards de l'équipe, pour cette super ambiance, cette entraide mutuelle, mais aussi pour tous ces apéros, et ces soirées ! Merci à **Laure**, toujours là pour discuter, et pour m'avoir fait découvrir les meilleurs mojitos de Toulouse !

Bon courage pour la soutenance. Merci à **Théo**, toujours à l'affût des nouveaux papiers!!
Merci à **Srdana**, pour ta bonne humeur dans le bureau ! Un clin d'œil à **Elodie**, qui commence, tout ira bien tu verras !

Merci à **Marina**, qui reprend le projet ! Merci pour ces derniers mois, ça m'a fait plaisir de travailler avec toi !! Mène- le projet à bien et n'oublie pas de toujours avoir le power patate !
(Je t'en fais don !!!)

Merci également aux anciens de l'équipe **Anne VF, Laure D, Anfina, Ivan**, ça m'a fait plaisir de vous revoir le jour J ! Merci à **AnneSo** anciennement membre de la dream team, pour ces années de bureaux communs où régnaient une très bonne ambiance, et ça fait toujours plaisir de te revoir quand tu reviens sur Toulouse.

Et enfin, un grand merci à tous pour mon calendrier 2016 !! Vous m'avez envoyé du rêve !

Un grand merci à mes copines, mes chéries, mes futures bridesmaids : **Axelle, Marie et Mélissa**. Vous êtes tellement parfaites, géniales, je suis chanceuse d'avoir des amies comme vous. Un gigantesque merci pour votre soutien sans faille, pour cette amitié incroyable qui nous unit et qui, je l'espère, durera toujours (je nous vois bien raconter nos exploits à nos petits-enfants), merci pour me comprendre aussi bien, être présentes dans les moments importants quoi qu'il arrive, mais aussi pour toutes ces soirées enflammées au Wallace, pour tous nos rires, fous-rires, pour vos réactions à l'annonce du mariage, pour cette complicité, pour tous nos souvenirs, et tous ceux qu'ils restent à venir ensemble. Une année pleine d'émotion se profile, et j'ai hâte d'en partager les moindres détails avec vous. Je vous aime !!!

Merci à **Charly** pour toutes ces années à avoir tenu parfaitement le rôle de lil'bro, et à me chambrer sur le RCT (en attendant trois coupes d'Europe et un doublé). Tu pourras d'ailleurs admirer le beau stade Mayol en juillet prochain.

Merci à **Caroline et Renaud**, pour toutes ces soirées du vendredi soir où on l'a toujours été bien reçu, et où l'on pouvait se détendre après une semaine de dur labeur ! A très vite au Havre !

Merci à **Célia, Alex D, Alex B, Nicolas, Pauline**, et tous ceux que j'oublie pour votre soutien, et ces moments que l'on a partagés.

Un grand merci à ma famille, **oncles, tantes, cousins, cousines**. On dit souvent que ne choisit pas sa famille, j'ai eu de la chance au tirage. Merci pour votre soutien, et pour votre présence le jour J. Merci de tout cœur à **mes mamies**, vous êtes extraordinaires, et tellement fortes. Vous êtes nos piliers, merci pour ce que vous m'avez donné, et appris. Merci à ma **belle-famille** pour leur soutien et leur présence le jour de la soutenance, qui m'a énormément touché !

Un ENORME merci à mes **parents**, pour votre confiance, vos encouragements, votre soutien sans faille, pour croire, et de toujours prendre le temps de me conseiller. Vous vous êtes toujours battus pour moi, et m'avez tout donné pour réussir Je vous en serai toujours reconnaissante. Vous me manquez tous les jours ici. C'est tellement difficile pour moi de partir de la maison à chaque fois. On sera toujours tous les trois envers et contre tout. Je vous aime.

Et enfin, toi, toi mon tout mon toit, **Thibault** !

Avec toi j'irai au bout du monde, pour toi je ferai n'importe quoi ! Un très grand merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien, pour être capable de me faire rire même si ça ne va pas, pour ta patience au cours de ma thèse, pour ton soutien indéfectible, et surtout pour croire en moi plus que moi-même. Notre rencontre improbable était écrite. Tu es ma bouée de secours, mon roc, mon équilibre, mon destin. Un nouveau chapitre commence pour nous, et j'ai vraiment hâte de découvrir ce qu'il nous réserve.

Comment finir ces remerciements, sans voir une pensée pour mes **Grand-pères...**

Table des matières

Liste des principales abréviations

Résumé

Summary

PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I : La réplication de l'ADN chez les eucaryotes supérieurs

I.	L'initiation de la réplication	11
A.	Mise en place des origines de réplication	11
B.	Régulation des origines de réplication	14
II.	L'élongation de la réplication	19
A.	Les facteurs de la fourche de réplication	20
B.	Les ADN polymérases réplcatives.....	22
III.	La terminaison de la réplication.....	24

CHAPITRE II: Le stress réplcatif: causes et conséquences

I.	Les causes du stress réplcatif	28
A.	La dérégulation des facteurs de la réplication	28
B.	Interférence entre la réplication et la transcription	29
C.	La réplication des ADN non-B.....	30
D.	Les lésions de l'ADN.....	34
II.	Les conséquences du stress réplcatif.....	35

CHAPITRE III: Les réponses cellulaires au stress réplcatif

I.	Activation du checkpoint de phase S	41
A.	L'activation d'ATR aux fourches bloquées	43
1.	Le complexe ATR/ATRIP/ADNsb	43
2.	L'hétérotrimère 9-1-1 et TopBP1	44
B.	Chk1 : effecteur du checkpoint de phase S	46
1.	La localisation de Chk1	46
2.	Les fonctions de Chk1.....	48
3.	La régulation de Chk1	52
II.	La tolérance des dommages	56

A.	Le contournement des lésions ou « Damage avoidance »	58
B.	La synthèse translésionnelle	59
1.	Rôle de la mono-ubiquitination de PCNA dans la synthèse translésionnelle.....	59
2.	Les modèles de la synthèse translésionnelle	63
3.	Le choix des ADN polymérases TLS	64
III.	Les ADN polymérases translésionnelles	65
A.	Généralités sur les ADN polymérases de la famille Y	65
B.	Rev1	66
C.	L'ADN polymérase Iota.....	68
1.	Les domaines fonctionnels de pol Iota.....	68
2.	Le rôle de pol Iota dans la gestion des dommages	69
D.	L'ADN polymérase Eta	70
1.	Les domaines fonctionnels de pol Eta	70
2.	Rôle de pol Eta dans le franchissement des dommages induits par les UV.....	70
3.	Rôle de pol Eta au niveau des sites fragiles communs.....	72
E.	L'ADN polymérase Zeta	72
F.	Primpol	73

CHAPITRE IV: L'ADN polymérase Kappa

I.	Structure et domaines fonctionnels de pol Kappa	76
II.	Les fonctions biologiques de pol Kappa.....	79
A.	Réplication de l'ADN génomique	79
B.	Réplication de l'ADN endommagé et synthèse translésionnelle	80
C.	Rôle dans la réparation de l'ADN endommagé	82
1.	Pol Kappa et les dommages induits par les UV	82
2.	La réparation des ICLs.....	83
3.	Rôle dans la recombinaison homologue	83
III.	Régulation de pol Kappa dans les cellules de mammifères.....	84
A.	La régulation de la fonction de pol Kappa.....	84
B.	Dérégulation de l'expression de pol Kappa dans les cancers : conséquences sur la stabilité génomique.....	85

PARTIE II: RESULTATS

I.	ADN polymérase Kappa et checkpoint de phase S	90
A.	Découverte de l'implication de pol Kappa dans le checkpoint de phase S	90

1.	Contexte et objectifs	90
2.	ARTICLE: "DNA polymerase κ -dependant DNA synthesis at stalled replication forks is important pour chk1 activation." Embo Journal, 2013	91
3.	Conclusion	93
B.	Mécanismes moléculaires reliant pol Kappa au checkpoint de phase S.....	94
1.	Construction des mutants de pol Kappa	94
2.	Analyse de la formation de foyers.....	97
3.	Recrutement des mutants de pol Kappa à la chromatine.....	99
4.	Effet des mutants sur la signalisation du checkpoint de phase S.....	101
5.	Etude de l'interaction de pol Kappa avec des partenaires clés du checkpoint de phase S.	105
C.	Conclusion sur le rôle pol Kappa dans le checkpoint de phase S.....	110
II.	Rôle de Pol Kappa dans la stabilisation de Chk1 en réponse à un stress réplicatif	113
A.	Contexte et objectif.....	113
B.	Pol Kappa est requise pour la stabilité de Chk1 après stress réplicatif.....	114
C.	USP7 : un nouveau régulateur de pol Kappa.....	116
1.	USP7 requis pour la stabilité de pol Kappa	116
2.	Interaction entre Pol Kappa et USP7	118
3.	Pol Kappa régulée par ubiquitination.....	120
4.	USP7 stabilise pol Kappa dans le noyau	122
D.	Pol Kappa est importante pour stabiliser le complexe USP7/Chk1	124
E.	Conclusions sur la stabilisation de Chk1 en réponse à un stress réplicatif	126
III.	Rôle potentiel de pol Kappa dans des régions hétérochromatiniennes	128
A.	Mise en évidence de l'interaction entre Pol Kappa et CENP-B	128
B.	Généralités sur les centromères et CENP-B	129
C.	Conclusion sur le rôle potentiel de Pol Kappa dans les régions d'hétérochromatine	132

PARTIE III: CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE

I.	Pourquoi pol Kappa est-elle importante pour la phosphorylation de Chk1 ?.....	135
A.	La fonction polymérase de pol Kappa	135
B.	La stabilité protéique de Chk1 requiert pol Kappa.....	136
II.	Comment pol Kappa est recrutée à la chromatine ?	139
III.	Implication de pol Kappa dans des séquences particulières du génome	142
IV.	Les conséquences cellulaires de l'absence de pol Kappa	143

ANNEXES

Le domaine N-Clasp de pol kappa

I. Réalisation et étude du mutant Δ -clasp68	149
II. Etude du mutant pol Kappa Δ Clasp 68	150
III. Conclusion.....	152

Matériels et méthodes

I. Culture cellulaire	155
II. Transfection de siARNs et plasmides	155
III. Clonage pEGFP-C2 Kappa Δ clasp.....	157
IV. Extraits protéiques totaux	157
V. Extraits CSK	157
VI. Extrait protéiques nucléaire et immunoprécipitation	158
VII. Proximity Ligation Assay	159
VIII. Fractionnement cellulaire	160
IX. Analyse des protéines par Western Blot	161
X. Ubiquitination de Pol Kappa	162

BIBLIOGRAPHIE

Liste des principales abréviations

8 oxoG : 8 oxoguanosine

9-1-1: Rad9-Rad1-Hus1

53BP1: p53 Binding Protein

ADN: Acide DesoxyriboNucléique

APC: Anaphase Promoting Complex

ARN: Acide RiboNucléique

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR: ATM and Rad3 related

ATRIP: ATR Interacting Protein

BER: Base Excision Repair

BPDE: Benzo[a]Pyrène Diolepoxide

BRCA1: Breast Cancer 1

Cdc6: Cell division cycle 6

Cdk: Cyclin-dependant kinase

Cdt1: Chromatin licensing and DNA replication 1

Chk1: Checkpoint kinase 1

CRL4^{cdt2}: Cullin 4-DDB1-CDT2

DDK: Dbf4-dependant promoting kinase

dNTP: Désoxyribonucléotide triphosphate

G4: G quadruplex

HU: Hydorxyurée

MCM: Mini Chromosomal Maintenance

Mono-ub: Mono-ubiquitinylé

NER: Nucleotide Excision Repair

NLS: Nuclear Localization Signal

ORC: Origin Recognition Complex

PCNA: Proliferating Cell Antigen

PIP: PCNA Interacting Protein

Pol: Polymérase

Pol TLS : Polymérase Translésionnelle

Pré-IC : Complexe de pré-initiation

Pré-RC: Complexe de pré-réplication

RFC : Replication Factor C

RPA : Replication Protein A

Ub : Ubiquitinylé

UBM : Ubiquitin-Binding Motif

UBZ: Ubiquitin-Binding Zinc finger

USP1: Ubiquitin Specific Peptidase 1

USP7: Ubiquitin specific Peptidase 7

UV: Ultra-Violet

TLS: Translésion

XP-V: Xeroderma pigmentosum variant

Résumé

La réplication de l'ADN est un évènement majeur pour la cellule car elle permet la duplication fidèle du matériel génétique. Il s'agit d'une étape critique du cycle cellulaire, car les fourches de réplication rencontrent fréquemment des barrières naturelles ou des lésions d'origine endogènes (lésions oxydatives) ou exogènes (agents physiques ou chimiques), sources de cassures chromosomiques et donc d'instabilité génétique. Une des réponses à ces fourches bloquées est l'activation du point de contrôle (checkpoint) de la phase S du cycle cellulaire. Nous avons montré que l'ADN polymérase Kappa (pol Kappa), polymérase dite translesionnelle en raison de ses capacités à franchir des lésions sur l'ADN, s'avère être aussi un acteur du point de contrôle de phase S. En effet, la déplétion de pol Kappa par ARN interférence dans différentes lignées cellulaires ou par immunodéplétion d'un extrait de Xénopé, entraîne un défaut de phosphorylation de Chk1. Pol Kappa est impliquée dans la synthèse de brins naissants d'ADN au niveau des fourches bloquées, ce qui facilite le recrutement du complexe 9-1-1 composé des protéines Rad9, Rad1 et Hus1 et permet alors, une activation correcte du checkpoint de phase S.

Afin de décrypter le rôle de pol kappa, nous avons construit différents mutants et nous avons analysé leur capacité à former des foyers, à être recrutés à la chromatine et à interagir avec différents partenaires dans des conditions d'activation du point de contrôle de phase S. Nous avons pu constater que le mutant du domaine d'interaction à PCNA était incapable de former des foyers. Nous avons ensuite observé en condition de stress réplcatif, pol Kappa était recrutée à la chromatine grâce à son domaine d'interaction à PCNA et par différentes approches biochimiques, nous avons pu voir que pol kappa interagissait avec Rad9 et Chk1.

Nous avons également mis en évidence qu'en l'absence de pol kappa, le taux de Chk1 dans le noyau diminuait, suggérant une régulation commune entre Chk1 et pol Kappa. En effet, nous avons démontré que pol Kappa, comme Chk1, était régulée par l'ubiquitine hydrolase USP7. En effet, l'interaction entre pol Kappa et USP7 est augmentée en condition de stress. Nous avons pu voir, qu'à l'instar de Chk1, l'absence d'USP7 entraînait une baisse du niveau de pol kappa dans le noyau. Ainsi nous proposons qu'en réponse à un stress réplcatif, pol Kappa et Chk1 soient stabilisés par un processus de dé-ubiquitination par USP7, permettant leur recrutement à la chromatine et une activation correcte du checkpoint de phase S.

Parallèlement à ces travaux, des publications récentes montrent une implication possible de pol Kappa au niveau des séquences répétées. Nous avons pu mettre en évidence une interaction entre pol Kappa et Cenpb, protéine centromérique reconnaissant une séquence de 17 paires de bases dans l'ADN α -satellite. Ces résultats préliminaires suggèrent que le rôle de pol Kappa dans le checkpoint de phase S concerne notamment les régions d'hétérochromatine.

L'ensemble des résultats obtenus montre l'importance de pol Kappa dans le maintien de la stabilité génomique, par son rôle dans le checkpoint de phase S, et par son implication dans la régulation de Chk1 en condition de stress réplcatif.

Summary

DNA replication is a major event for cells which allow the faithful duplication of genetic material. It is a critical step of cell cycle, because replication forks encounters frequently natural barriers (non B-DNA structures), exogenous lesion (chemicals agents), or endogenous damage (oxidative lesions). These different barriers can be the source of chromosome breakage and genetic instability. To overcome the stalled forks, cells have evolved two major mechanisms: the induction of ATR replication checkpoint pathway and the recruitment of specialized DNA polymerase to perform translesion synthesis. These two pathways are essential to maintain genomic stability.

Human DNA polymerase Kappa (pol Kappa), the most conserved specialized DNA polymerase, is best known to participate in translesion synthesis. Recently, we have shown that pol kappa has also a crucial role in the S-phase checkpoint activation. Indeed, pol Kappa is implicated in the synthesis of short DNA intermediates at the stalled forks, facilitating the recruitment of 9-1-1 clamp, and is required for an optimal phosphorylation of Chk1, the main effector of the s-phase checkpoint. During my PhD thesis, I explored the molecular mechanisms underlying this newly identified role. We have constructed several pol kappa mutants, and we have observed that in the PCNA binding domain is required to form foci in response to replication stress. We have also evidenced the requirement of this domain for pol Kappa recruitment on chromatin. By different experimental approaches, we have unveiled that pol Kappa, Rad9 and Chk1 form a complex.

The absence of pol Kappa leads to a decrease of the Chk1 protein level in the nucleus, suggesting a potential common regulation between pol Kappa and Chk1. Based on this observation, we have studied how pol Kappa is regulated upon a replication stress. We found that pol Kappa seems to be regulated by USP7, an ubiquitin hydrolase known to regulate Chk1. We have demonstrated an interaction between pol Kappa and USP7, which is stimulated after replication stress. Moreover, USP7 depletion leads to a decrease of pol Kappa level in the nucleus, suggesting that de-ubiquitination of pol Kappa could be a prerequisite for its checkpoint function and its stability.

Furthermore, recent publications have shown a potential implication of pol Kappa in the replication of repeated sequences. Preliminary results revealed an interaction between pol Kappa and Cenpb, a centromeric protein that recognizes and binds a 17 nucleotides sequence in the centromeric α -satellite DNA. These data suggest an implication of Pol Kappa in the replication of heterochromatin regions.

Taken together these data highlight an important role of Pol Kappa in managing the s-phase checkpoint response through the regulation of Chk1 status

Partie I : Introduction générale

Chapitre I : La réplication de l'ADN chez les eucaryotes supérieurs

Chaque cycle cellulaire est témoin de la division d'une cellule-mère en deux cellules-filles. Cependant, avant cette division, la cellule-mère a besoin de dupliquer fidèlement son matériel génétique. La machinerie de réplication nommée réplisome se compose d'un grand nombre de protéines qui sont finement régulées et coordonnées afin d'assurer la duplication fidèle et unique du génome, préambule obligatoire à la ségrégation des chromosomes. La réplication s'initie aux origines de réplication, puis progresse de manière bi-directionnelle et semi-conservative le long des chromosomes, cette étape d'élongation se termine lors de la rencontre des fourches de réplication (LEHMAN et al., 1958 ; BESSMAN et al., 1958).

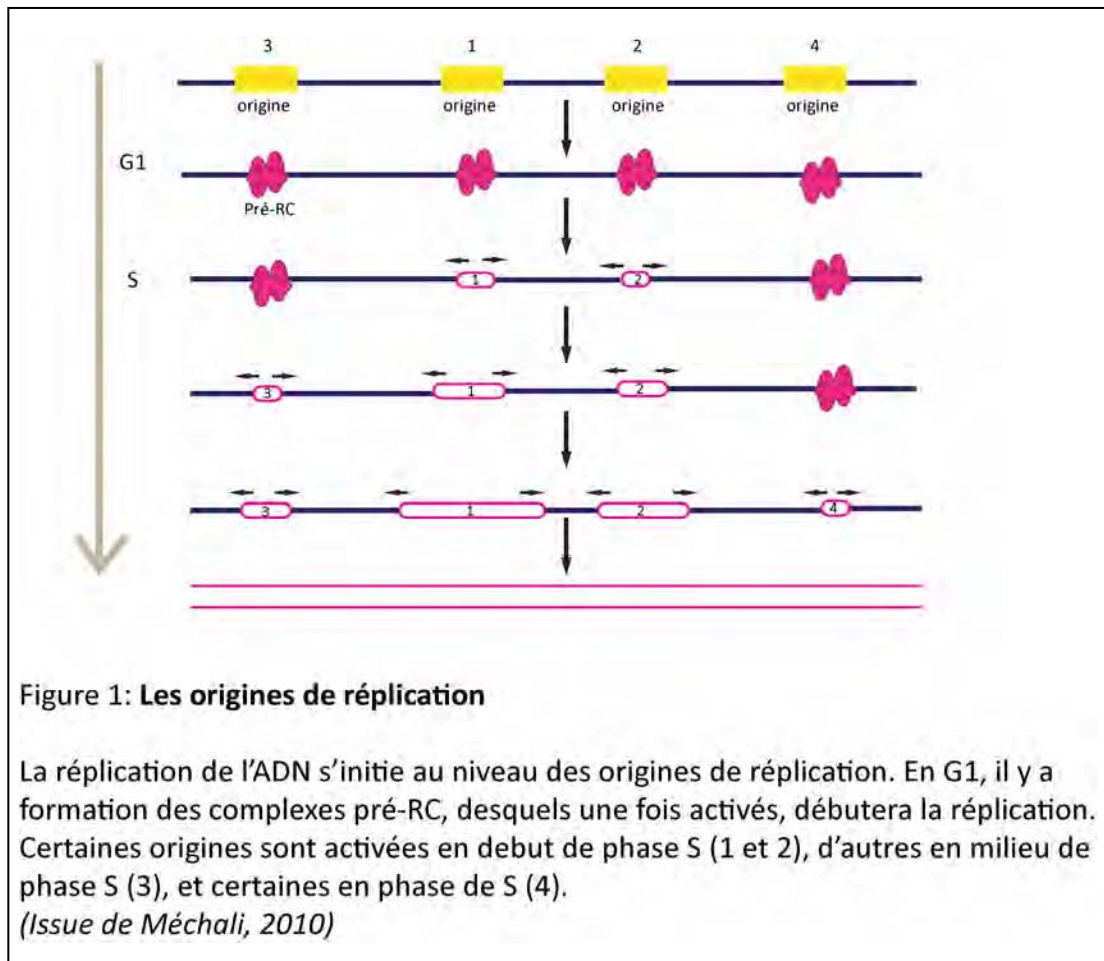
I. L'initiation de la réplication

A. Mise en place des origines de réplication

Parmi toutes les origines présentes dans le génome, entre 30 000 et 50 000 sont activées de manière séquentielle au cours de la phase S du cycle cellulaire. L'activation des origines de réplication permet l'ouverture de la double hélice d'ADN, afin d'en séparer les deux brins, et permettre l'accès à la machinerie de réplication.

La mise en place des origines de réplication commence à la transition entre les phases M et G1 du cycle cellulaire. L'hexamère ORC (Origin Recognition Complex 1-6) se lie sur l'origine de réplication en début de G1, où il sert de plateforme pour le recrutement de cdt1 (Chromatin licensing and DNA replication factor 1) et de cdc6 (cell division cycle gene 6). Ces deux protéines vont faciliter le chargement des hélicases MCM 2-7 (mini chromosome maintenance) au niveau des origines de réplication (pour revue Leman et Noguchi, 2013) (Maiorano, Moreau, et Méchali, 2000) (Remus et al., 2009). L'ensemble de

ces protéines forme alors le complexe de pré-RC (pré-Replication Complex) (fig 2). A cette étape, l'origine de réplication est dite « licensed », ou prête à être activée.



A la transition G1/S, le complexe pré-RC est activé pour former le complexe pré-IC (pre-Initiation Complex). Cette activation est due à l'action des kinases CDK (cycle-Dependant-Kinase) et DDK, appelé aussi, cdc7-Dbf4, (Dbf4-Dependant-kinase) (Nougarède et al., 2000 ; Zou et Stillman, 2000). Elles vont faciliter le chargement de cdc45 et du complexe GINS (composé de Sld5, Psf1, Psf2, Psf3) (Takayama et al., 2003).

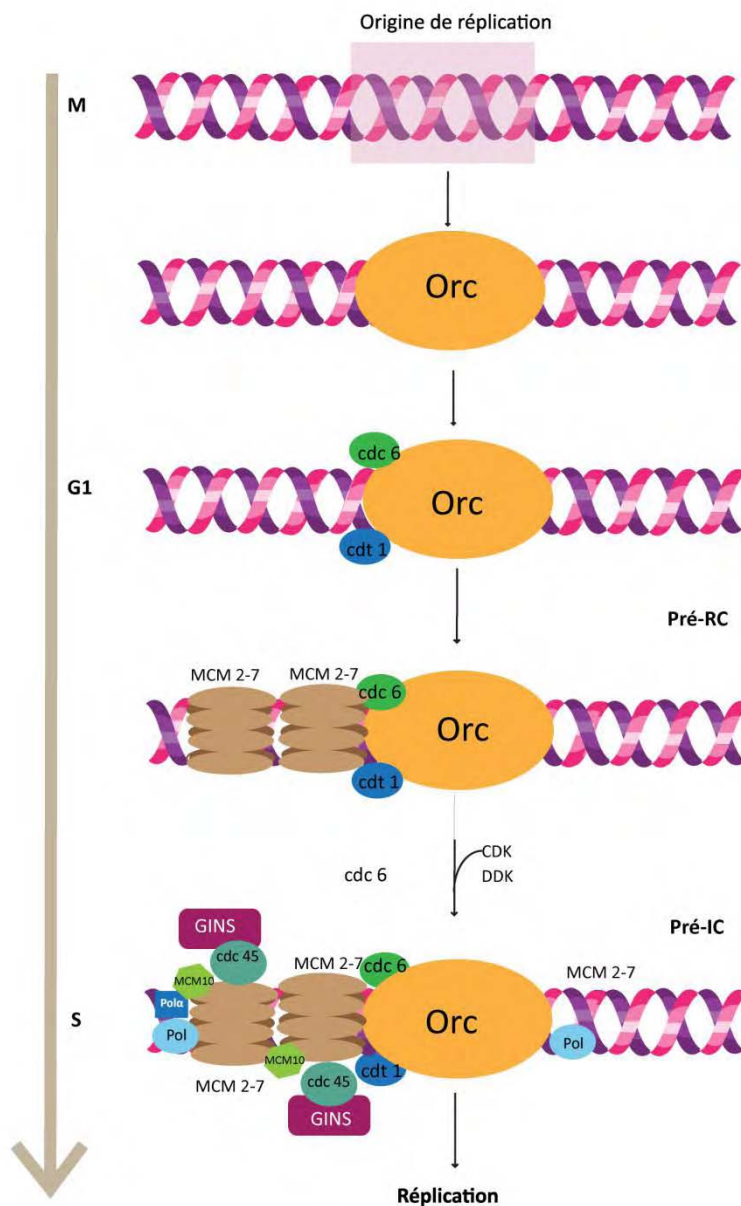


Figure 2: **Mise en place des origines de réplication**

En fin de mitose, les six-unités du complexe Orc se fixent à l'ADN et permettent le recrutement au cours de la phase G1 des protéines formant le complexe de pré-réplication. A la transition G1/S, la phosphorylation du pré-RC par les kinase CDK-DDK permettent le chargement des protéines du replisome, et le déchargement de cdt1 et cdc6, ce qui forme le complexe de pré-initiation. La réplication débute. (Adapté de Fragkos N. et al, 2015)

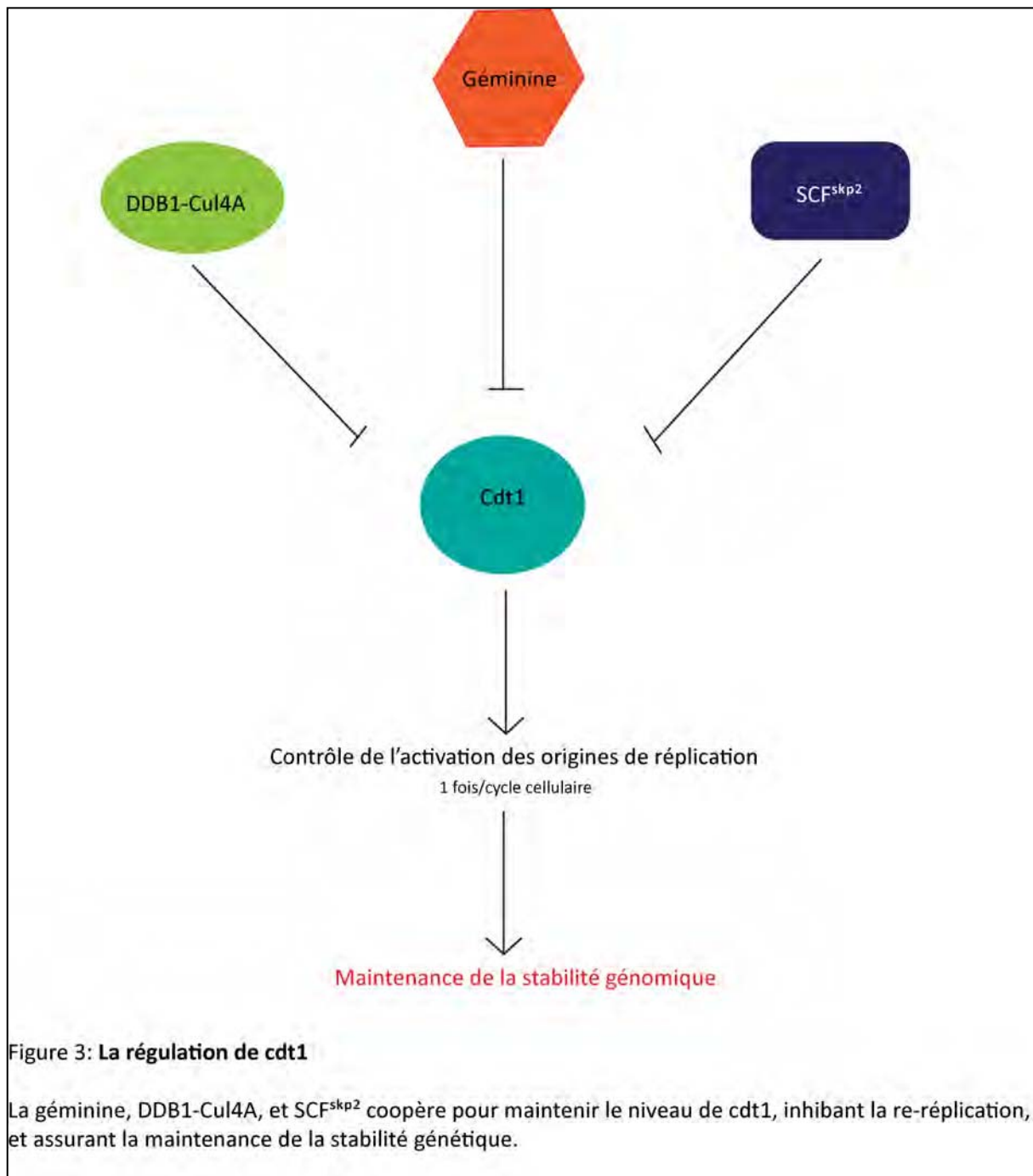
MCM-cdc45-GINs forment alors le complexe CMG (Moyer, Lewis, et Botchan, 2006), qui stimule l'activité de l'hélicase MCM 2-7 (Ilves et al., 2009). Cdc45 permet le recrutement des ADN polymérases α , δ , et ϵ . La protéine MCM 10 est aussi recrutée, elle faciliterait l'ouverture la double hélice (Walter et Newport, 2000). A ce moment, l'origine est dite activée ou « fired », l'ouverture et le déroulement de l'ADN commence alors.

B. Régulation des origines de réplication

Comme la cellule se divise, l'information génétique qu'elle contient doit être transmise à la génération suivante. Pour maintenir l'intégrité du génome, la réplication doit être complète et non redondante à chaque cycle cellulaire. Pour cela, la cellule a mis en place des mécanismes de régulation qui préviennent la re-réplication, c'est-à-dire la réutilisation d'une origine déjà activée. En effet la re-réplication conduit à l'induction d'un stress réplicatif et peut être vecteur d'instabilité génétique. Les protéines soumises à une régulation stricte afin d'éviter la re-réplication sont : ORC, cdc6, et cdt1.

Après initiation de la réplication, la protéine Orc1 du complexe ORC est ubiquitinylée sur la chromatine entraînant sa dégradation par le protéasome (Méndez et al., 2002). Puisque la présence de toutes les protéines ORC est requise pour le recrutement des MCM, la dégradation de Orc1 empêche donc l'origine de se réinitier.

Chez les eucaryotes supérieurs, l'essentiel de la régulation concerne cdt1 (Fig 3). En effet, l'expression de cdc6 semble stable au cours du cycle cellulaire. Au cours de la phase S, cdc6 est phosphorylée par cycline A/cdk2, la protégeant de la dégradation, elle est exportée vers le cytoplasme par crm1 afin de limiter sa présence dans le noyau (Kalfalah et al., 2015).



La seule surexpression de cdt1 dans des cellules humaines entraîne une re-réplication. Cdt1 est phosphorylée par le complexe cycline A/cdk2 avant la formation du pré-IC (Fig 2), ce qui conduit à sa reconnaissance par l'E3 ubiquitine ligase SCFSKP2, et à sa dégradation par le protéasome (pour revue (Blow et Dutta, 2005) . Il existe une autre voie de dégradation de cdt1, dépendante de la réplication. Cdt1 possède un domaine d'interaction à PCNA (facteur de processivité des polymérase répliquatives), ce qui entraîne sa liaison à

PCNA pendant la réplication. Il est reconnu par l'E3 ubiquitine ligase Cul4-Ddb1^{cdt2}, ce qui mène à sa dégradation par le protéasome (Nishitani et al., 2001) .

Cdt1 peut être inhibée par la protéine géminine, durant la phase S et G2. Elle protège cdt1 de l'ubiquitination, et permet son accumulation en G2 et M sous forme inactive. En fin de mitose, la géminine est dégradée sous l'impulsion d'APC (Anaphase Promoting Complex) ce qui libère l'activité de cdt1 et permet le chargement des MCM. La géminine joue un rôle majeur dans l'inhibition de la re-réplication (Fig 4). La déplétion d'Emi1, un inhibiteur de

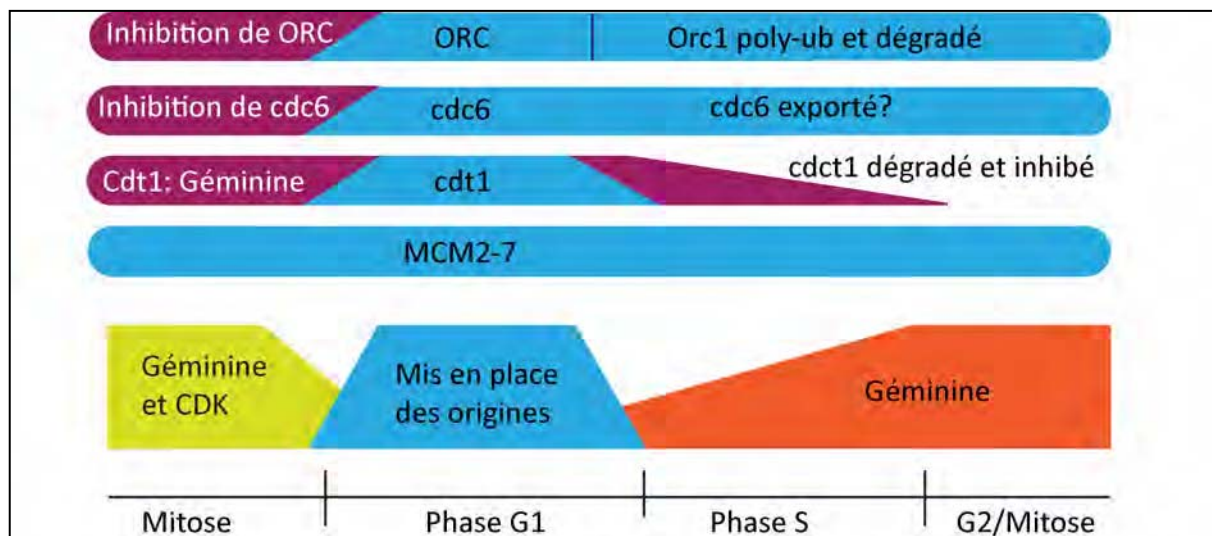


Figure 4: Régulation de l'initiation en fonction des phases du cycle cellulaire

La mise en place des origines de réplication est active seulement en G1 (Bleu). L'initiation de la réplication est inhibée en phase S et G2, par l'augmentation de géminine (Orange), et en mitose par l'action combinée des CDK et de géminine (Vert). En haut, l'activité des composants du pré-RC est montrée. Le violet correspond aux protéines inactives exportées, ou dégradées, et le bleu aux protéines actives.

(Adapté de Blow et Dutta 2005)

l'activité du complexe APC/C durant la phase S et la phase G2, cause de la re-réplication. L'activation d'APC aboutit à la dégradation de la géminine, de la cycline A, et de la cycline B1, ce qui cause de la re-réplication dépendante de l'activation cdt1, et l'inactivation de cdk2/cycline A, et cdk1/cycline B1 (Machida and Dutta, 2007).

La régulation par les CDK joue un rôle prépondérant dans la régulation des origines de réplication. En effet, il a été montré chez *S. pombe* que l'inactivation de CDK1 ou de la cycline mitotique cdc13 en G2 permettait une forte re-réplication de l'ADN durant un seul

cycle cellulaire (Broek et al., 1991; Hayles et al., 1994) . Ce qui indique que le re-chargement de MCM2 a lieu en G2, quand l'activité CDK est inhibée. Il a également été montré chez *S. cerevisiae* que CDK1 était requis pour la transition du complexe pré-RC vers le complexe pré-IC (Dahmann et al., 1995). De plus, les CDKs promeuvent l'export nucléaire de cdt1 et MCM 2-7 durant la phase S, G2 et en mitose précoce, prévenant leur accès à l'ADN. L'inhibition de tous ces contrôles aboutit à de la re-réplication (Blow et Dutta, 2005).

Les études menées sur les levures ont montré que l'initiation de la réplication prenait place au niveau de séquences spécifiques. En effet, la réplication automone d'un plasmide a été trouvée conduite par une séquence de 200 paires de bases (bp), chez *S. cerevisiae*. Cette séquence est nommée ARS, « Autonomously Replication Sequence ». Elle contient une séquence consensus de 11 à 17 bp appelé ACS (ARS Consensus Sequence), qui sera par la suite reconnue par ORC afin de former le pré-RC (pour revue (Renard-Guillet et al., 2014)). Le positionnement des nucléosomes autour des origines semble être important. Les ACS se trouvent dans des régions appauvries en nucléosomes (NDR Nucleosome depletion region) (Berbenetz, Nislow, et Brown, 2010 ; Eaton et al., 2010), ce qui faciliterait la fixation du complexe ORC, mais aussi influencerait sur le bon repositionnement des nucléosomes environnants.

Chez *S. pombe*, les origines de réplication sont riches en A/T. De façon cohérente, l'homologue d'Orc4 chez *S. pombe* possède un motif « A-T hook », requis pour la reconnaissance des origines (Chuang et Kelly, 1999).

Chez les métazoaires, aucune séquence spécifique n'a été retrouvée. Cependant, récemment, la présence de motifs riche en G, OGRE (Origine G-Rich Repeat Element), a été reportée (Cayrou et al., 2011) en amont des origines de réplication. Il est proposé que ces séquences OGREs forment des G-quadruplex. Les G-quadruplex se composent de plusieurs plateaux comprenant 4 guanines reliés par des ponts hydrogènes. En effet, les G-quadruplex ont été retrouvés largement associés aux origines de réplication chez l'homme (Besnard et al., 2012). Des études à grande échelle ont montré un chevauchement entre les origines de réplication et les îlots CpG (Cadoret et al., 2008 ; Cayrou et al., 2011), dans des lignées cellulaires humaines et murines. Ces résultats coïncident parfaitement avec la présence de motifs OGREs au niveau des origines de réplication. La méthylation des îlots CpG pourrait

avoir un rôle dans la régulation des origines de réplication. En effet, il apparaît que les ratios d'initiation de la réplication sont associés à la présence de méthylation sur les îlots CpG, mais ne sont pas compatibles avec les événements de transcription (Martin et al., 2011), car la méthylation des îlots CpG est connue pour être une marque répressive pour la transcription.

L'activation des origines de réplication est contrôlée par un programme temporel (le timing de réplication), c'est-à-dire que les origines de réplication s'activent dans un ordre établi. Le timing de réplication est mis en place en tout début de G1 au TDP (Timing Decision Point) (Dimitrova et Gilbert, 1999). Le timing de réplication est très conservé au cours de l'évolution. Les études comparatives entre l'humain et les souris montrent une très grande conservation du timing de réplication (Yaffe et al., 2010).

Les origines ne sont pas toutes activées à chaque cycle cellulaire. Une question se pose alors : Comment sont choisies celles qui s'activent ? Les études penchent vers le modèle « stochastique contrôlé » où la probabilité d'activation serait fonction du contexte génomique (Raghuraman et Brewer, 2009). Ce modèle expliquerait pourquoi les origines sont mises en place en G1, mais activées seulement en phase S. Par exemple, l'assemblage de l'enveloppe nucléaire, incluant les lamines, aurait un impact sur le timing de réplication. En effet, l'assemblage doit être complet pour le repositionnement des domaines chromosomiques. Les facteurs recrutés sur des sites spécifiques de ces domaines créeraient un microenvironnement qui modulerait la formation des pré-RC (Dimitrova et Gilbert, 1999). Des expériences *in vitro* chez le Xénope montrent qu'à l'échelle du simple réplicon ou du cluster de réplication, le timing de réplication est aléatoire, car les séquences répliquées précocement ne coïncident pas entre deux cycles cellulaires consécutifs. Néanmoins, le timing de réplication de larges domaines n'est pas complètement stochastique puisque les foyers de réplication coïncident entre deux phases S consécutives précoces (Labit et al., 2008).

La protéine Rif1 (Rap Interacting Factor 1) a été découverte comme étant un régulateur du timing de réplication chez *S. pombe*. Rif1 est capable de réguler positivement ou négativement l'activation des origines, c'est-à-dire que sa présence ou son absence sur la chromatine influe sur le moment où l'origine s'active. En effet, les domaines répliqués en début de phase S peuvent être répliqués en fin de phase S, et inversement dans les mutants

déplétés en Rif1. Le site de liaison de Rif1 est distribué dans des régions intergéniques, le long du génome de *S. pombe*. Ces régions sont proches d'origines activées tardivement en phase S (Hayano et al., 2012). Bien qu'étant un régulateur du timing de réplication, l'absence de Rif1 n'entraîne pas de défaut de formation du pré-RC.

Récemment, mon équipe d'accueil a mis en évidence un nouveau régulateur du timing de réplication, l'ADN polymérase Theta (pol θ), une ADN polymérase spécialisée de la famille A. Pol θ est recrutée à la chromatine, en début de phase G1, où elle participe à la formation du complexe pré-RC. De plus, elle interagit avec les protéines Orc2 et Orc4 appartenant au complexe ORC. Elle régule le recrutement des MCM, puisque son absence entraîne une augmentation des MCM sur la chromatine. Pol θ et Rif1 ont un profil de recrutement similaire sur la chromatine en G1. L'absence de pol θ n'entraîne pas de diminution du niveau cellulaire de Rif1, ni de défaut de son recrutement à la chromatine. De façon intéressante, l'absence de pol θ entraîne une modification du timing de réplication (Fernandez-Vidal et al., 2014).

II. L'élongation de la réplication

Après l'initiation aux origines de réplication, l'étape d'élongation débute. Les hélicases chargées, au moment de la formation du complexe pré-RC, vont dérouler l'ADN, ce qui permet aux polymérases répliquatives associées à leur facteur de processivité PCNA d'accéder à la matrice d'ADN. Une hélicase supplémentaire, MCM8, vient s'ajouter afin de faciliter la progression du réplisome, notamment en cas de perturbation de la réplication (Lutzmann et al., 2012). Les ADN polymérases répliquatives sont capables de répliquer l'ADN dans le sens 5'→3'. Sur le brin continu, la réplication sera directe, et sur le brin retardé, la réplication se fait de façon discontinue, il y a génération de multiples fragments, les fragments d'Okazaki (Okazaki et al., 1968)

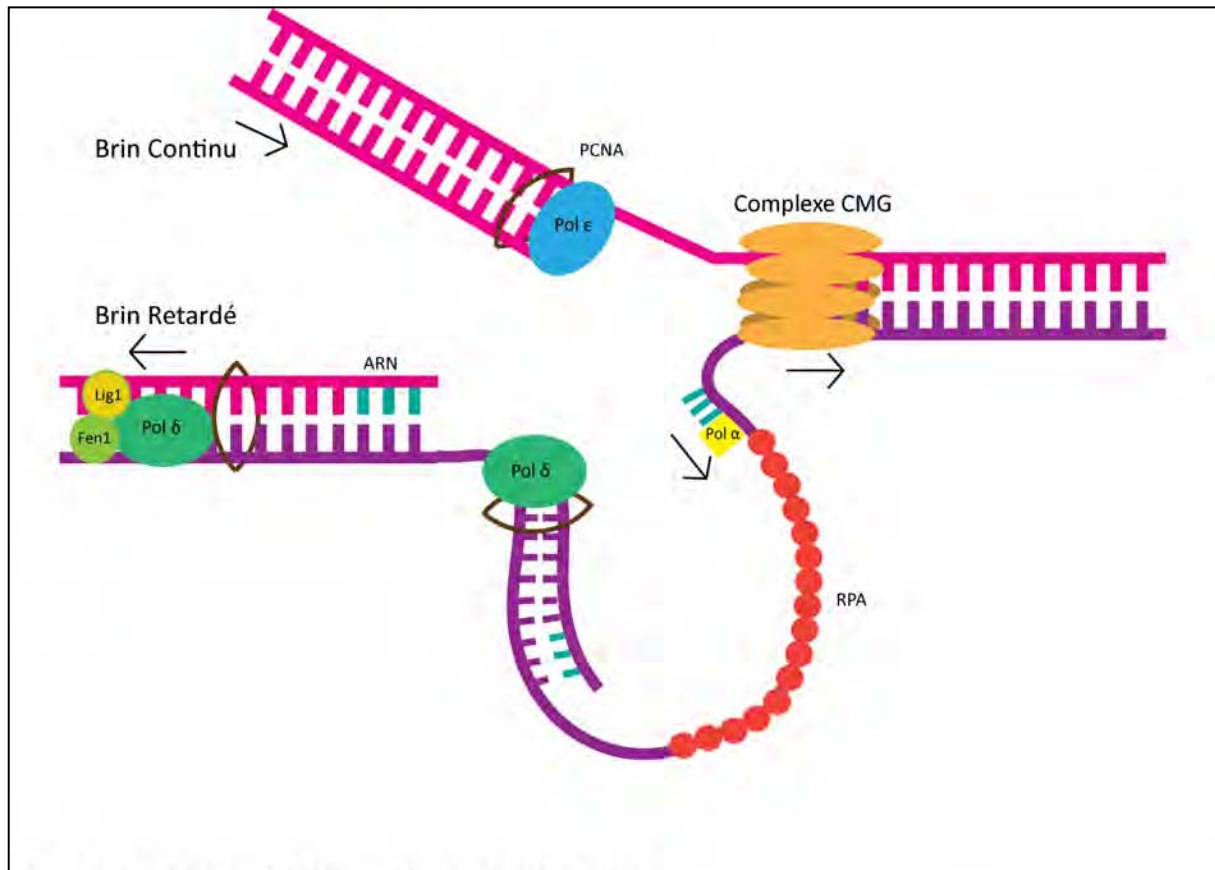


Figure 5: **Modèle simplifié d'une fourche de réplication**

Les MCM hélicases déroulent l'ADN. La réplication commence après synthèse des amorces ARN par pol α . La synthèse d'ADN, sur le brin continu, est assurée par pol ϵ , et la synthèse sur le brin retardé est assurée par pol δ . Sur le brin retardé, l'ADN simple brin est recouvert par RPA, et la maturation des fragments d'Okazaki est faite par l'endonuclease Fen1 et la ligase I.

(Adapté de McElhinny et al, 2008)

A. Les facteurs de la fourche de réplication

Après activation des origines de réplication, les ADN hélicases commencent à dérouler l'ADN, ce qui génère de l'ADN simple brin (ADNsb), qui est recouvert par une protéine affine pour l'ADN, RPA (Replication Protein A). RPA est composée de 3 sous-unités, la sous unité 70kDa dans laquelle se trouve le site de liaison à l'ADN, la sous-unité 32kDa, et la sous-unité 14kDa (Wold, 1997) .

Les ADN polymérases répliquatives ont besoin de nombreux facteurs afin de répliquer l'ADN. En effet, la conformation des ADN polymérases répliquatives ne leur confère pas une interaction stable avec l'ADN. Pour renforcer cette interaction, des pinces de glissements

(sliding clamp) ont été conservées au cours de l'évolution, et elles promeuvent la processivité des ADN polymérases.

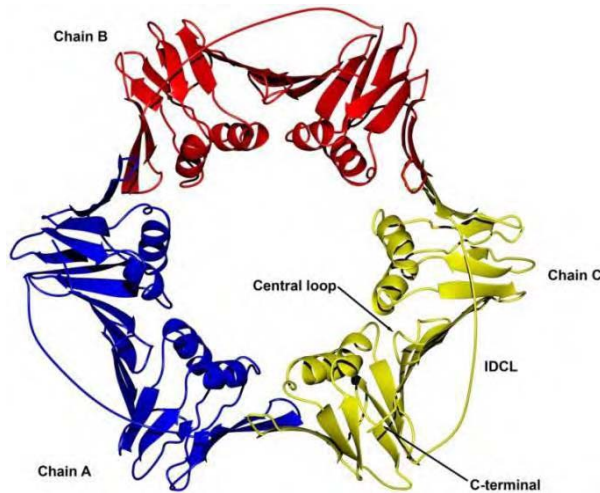


Figure 6 : **Structure de PCNA**

PCNA est un homotrimère. Chaque monomère est représenté par une couleur.

Issue (Carrasco-Miranda et al., 2014)

Chez les eucaryotes, la pince de glissement PCNA (Proliférating Cell Nuclear Antigen) est un homotrimère qui forme un anneau autour de l'ADN. Elle interagit en 3' de l'amorce d'ARN/ADN, et permet l'orientation des ADN polymérases. La stabilisation des ADN polymérases par PCNA stimule significativement leur processivité (jusqu'à 1000 fois) (Prelich et al., 1987). PCNA est donc un facteur essentiel de la réplication, mais aussi une plateforme d'interaction commune dans de multiples processus (réparation de l'ADN, signalisation du checkpoint).

PCNA doit être chargé au niveau des fourches de réplication. Sur le brin continu, il n'est chargé qu'une seule fois au niveau de l'origine mais sur le brin retardé, PCNA est constamment chargé et déchargé de la chromatine. Le chargement de PCNA est effectué par le complexe RFC (Replication Factor C), qui inclut Rfc1, Rfc2, Rfc3, Rfc4 et Rfc5. RFC est capable de reconnaître en 3', la jonction amorce/ADN et de recruter par hydrolyse de l'ATP, PCNA au niveau de ces jonctions (pour revue Moldovan, Pfander, et Jentsch, 2007) .

PCNA subit de nombreuses modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitination, des phosphorylations, de sumoylations, ou des acétylations (pour revue Moldovan, Pfander, et Jentsch, 2007)). PCNA possède 6 lysines dans ces régions N-terminale et C-terminale qui peuvent être acétylées. L'acétylation de PCNA joue un rôle dans la réplication de l'ADN, puisque PCNA acétylé présente une plus forte affinité pour pol δ

(Naryzhny et Lee, 2004). Il a été montré dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovarian) qu'il existait trois isoformes de PCNA avec différents statuts d'acétylation. PCNA peut être également sumoylé sur la lysine K164, la même que pour l'ubiquitination, durant la réplication non perturbée. La sumoylation de PCNA est médiée par l'E2- enzyme de conjugaison Sumo spécifique Ubc9 et l'E3 sumo ligase Siz1. La sumoylation de PCNA sur la lysine K164 est retrouvée chez la levure, dans les cellules de poulet DT40, et dans les extraits de Xénope. Il est montré que PCNA-sumo prévient la recombinaison et favorise la voie de tolérance des dommages dépendante du complexe Rad6/Rad18 (Shaheen et al., 2010) . La sumoylation de PCNA sur la lysine K164 est également retrouvé dans les cellules humaines, néanmoins son rôle est encore en débat. Il est proposé que PCNA-sumo prévienne la formation de cassures doubles brins si la fourche est bloquée par une lésion, mais également en inhibant la conversion de la fourche régressée en une cassure simple brin de l'ADN (Gali et al., 2012). Les autres modifications post-traductionnelles de PCNA seront développées plus tard dans l'introduction.

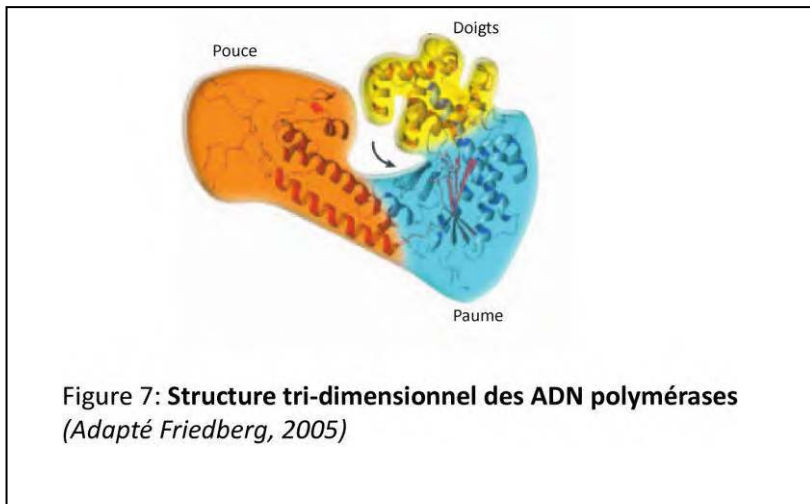
B. Les ADN polymérases répliquatives

Dans les cellules humaines, il existe 15 ADN polymérases. Ces ADN polymérases sont classées en famille en fonction de leur homologie de séquences (Tableau 1)

	<i>H. Sapiens</i>	<i>S. Cerevisiae</i>	<i>S. Pombe</i>
Famille A	Lambda Theta	Lambda	Lambda
Famille B	Alpha Delta Epsilon Zeta	Alpha Delta Epsilon Rev3	Alpha Delta Epsilon Rev3
Famille Y	Iota Kappa Eta Rev1	Rad30 Rev1	Kappa Eta Rev1
Famille X	Lambda Beta Mu Sigma Tdt	Pol 4 Sigma	Lambda Sigma

Tableau 1 : Familles des ADN polymérases classées en fonction de leur homologie de séquences ou structures (Adapté (Burgers et al., 2001))

Les ADN polymérases répliquatives, pol α , pol δ , et pol ϵ , appartiennent à la famille B des ADN polymérases et elles catalysent la réplication du génome nucléaire. Toutes ADN polymérases connues adoptent une conformation similaire à une main, où chaque domaine est important pour sa fonction, et représenté par (Fig 7) (Steitz, 1998) :



- La paume, où se trouve le domaine catalytique
- Le pouce, interagit avec l'ADN et facilite sa processivité
- Les doigts qui permettent un positionnement correct de la matrice et l'incorporation des nucléotides (pour revue (Johansson et Dixon, 2013)).

Pol α , également appelé la primase, est chargée sur l'ADN durant la formation du pré-IC. Elle est capable d'amorcer la réplication grâce à la synthèse d'une amorce ARN/ADN. Cette enzyme est constituée de 4 sous-unités, dont les sous-unités p180 et p48 contenant respectivement l'activité ADN polymérase et l'activité primase. A chaque départ de réplication, elle est capable de synthétiser un fragment court d'ARN de 10bp, puis de l'étendre en ajoutant environ 20 nucléotides, (Fig 5). Pol α va générer une seule amorce sur le brin continu, et une amorce (environ tous les 1000bp) pour chaque fragment d'Okazaki, sur le brin retardé (Maga et al., 2001 ; Hubscher, Maga, et Spadari, 2002).

Pol δ et pol ϵ sont composées de 4 sous-unités chacune : p125, p66, p50, p12 pour pol δ , et p261, p59, p17, p12 pour pol ϵ . Les plus grosses sous-unités portent l'activité catalytique et l'activité correctrice exonucléase 3'→5' (Liu et al., 2000). Cette activité exonucléase permet de corriger l'insertion d'un nucléotide mal apparié (McCulloch et Kunkel, 2008). Pol δ réplique l'ADN sur le brin retardé (Nick McElhinny et al., 2007), tandis

que pol ϵ a été montré comme étant la polymérase participant à la synthèse du brin continu (Pursell et al., 2007). Ces ADN polymérases sont très fidèles, grâce à leur site catalytique discriminant et à leur activité exonucléase. Elles génèrent une substitution ou une insertion/délétion pour 10 000 insertions correctes.

Pol α ne possède pas d'activité correctrice exonucléase 3'→5', ce qui explique sa plus faible fidélité. Cependant, il est à noter que pol δ pourrait participer à la correction des erreurs de pol α sur le brin retardé (Pavlov et al., 2006). L'activité exonucléase 3'→5' apparaît comme un garant de la stabilité génétique. Les pol δ et pol ϵ ont un taux très faible de mésappariement comparé aux taux obtenus avec ces mêmes polymérases mutées. Il est intéressant de noter, que l'absence d'activité exonucléase augmente la probabilité de développer un cancer. En effet, des études montrent que des souris ayant l'activité exonucléase de pol δ mutée ont une espérance de vie plus courte, et présentent une mutagenèse spontanée augmentée, se traduisant par une probabilité élevée de développer tous type de cancer (Goldsby et al., 2001). Chez l'homme, il a été montré que l'apparition de cancers était corrélée avec des mutations dans l'activité exonucléase de pol δ (Palles et al., 2013).

III. La terminaison de la réplication

Comme dit précédemment, la synthèse d'ADN par pol δ sur le brin retardé génère des fragments, dits les fragments d'Okazaki. Pol δ réalise la synthèse d'ADN d'un fragment d'Okazaki, jusqu'à l'amorce ARN/ADN du fragment précédent. Elle déplace la partie ARN, ce qui entraîne la formation d'une extrémité battante. L'endonucléase FEN1 (Flap EndoNuclease 1) entre alors en jeu (Fig 5), et clive l'amorce ARN du fragment d'Okazaki. La ligase I (LigI) relie la brèche formée entre les deux brins de fragments d'ADN. Parfois, le déplacement de l'amorce d'ARN par pol δ est plus importante, la brèche formée entre les deux fragments est plus importante, recouverte par RPA. La brèche sera clivée par Dna2, une hélicase/endonucléase, générant une extrémité plus courte, avec laquelle FEN1 procédera de façon identique à la première situation (pour revue Leman et Noguchi, 2013).

La terminaison de la réplication est établie, lorsque deux fourches de réplication se rencontrent. Les réplisomes sont alors dissociés de la chromatine par des mécanismes encore inconnus. Cependant, dans des extraits de *Xénope*, il a été montré que MCM-BP (nouveau facteur de liaison au MCM) participerait au déchargement des MCM 2-7 en fin de phase S (Nishiyama, Frappier, et Méchali, 2011).

Des études, réalisées dans des extraits de *Xénope* et de levure *S. Cerevisiae*, montrent que l'ubiquitination du complexe CMG est requise pour la terminaison de la réplication. Chez le *Xénope*, il a pu être montré que la poly-ubiquitination de Mcm7 sur la lysine K48 de l'ubiquitine, précédait le désassemblage de l'hélicase active de la chromatine durant la terminaison de la réplication. Ce désassemblage requiert l'action des protéines p97/VCP/cdc48, en effet, l'expression de la forme inactive de p97 prolonge l'association de l'hélicase répllicative sur la chromatine, et l'accumulation de la forme ubiquitinylée de MCM7 sur la chromatine (Moreno et al., 2014) . Ce mécanisme est conservé, et retrouvé chez la levure *S.Cerevisiae*. Les auteurs ont pu mettre en évidence, *in vivo*, l'ubiquitination de MCM7 par l'ubiquitine ligase SCF^{dia2} mène au désassemblage du complexe CMG de façon dépendante de cdc48/p97. En effet, cdc48 est requis pour séparer le complexe CMG ubiquitinylé en 3 parties. Une fois séparé du complexe GINs et de cdc45, MCM2-7 est moins stable et donc déchargé de l'ADN nouvellement répliqué (Maric et al., 2014) .

Chapitre II : Le stress réplcatif : causes et conséquences

La réplication fidèle de l'ADN est un challenge pour les cellules. L'avancée des ADN polymérases réplcatives peut être perturbée ou compromise par la dérégulation de facteurs de la réplication, ou par la présence d'obstacles de diverses natures (Fig 8).

La définition du stress réplcatif se réfère à la situation, qui engendre le ralentissement ou l'arrêt de la réplication, et donc le ralentissement ou à l'arrêt des fourches de réplication (Gelot, Magdalou, et Lopez, 2015 ; Zeman et Cimprich, 2014).

En conséquence, le stress réplcatif peut mener à des effondrements de fourches de réplication, provoquant de l'instabilité génétique. Le stress réplcatif est d'ailleurs retrouvé dans les étapes précoces de la tumorigénèse (Gorgoulis et al., 2005 ; Bartkova et al., 2005 ; Burrell et al., 2013 ; Flach et al., 2014).

Cependant, ces perturbations de la réplication sont prises en charge par des voies de signalisation, comme la voie ATR/Chk1 ou les voies de tolérance des dommages. Ces mécanismes préviennent l'instabilité génétique. Nous détaillerons ces mécanismes de réponses dans le chapitre III.

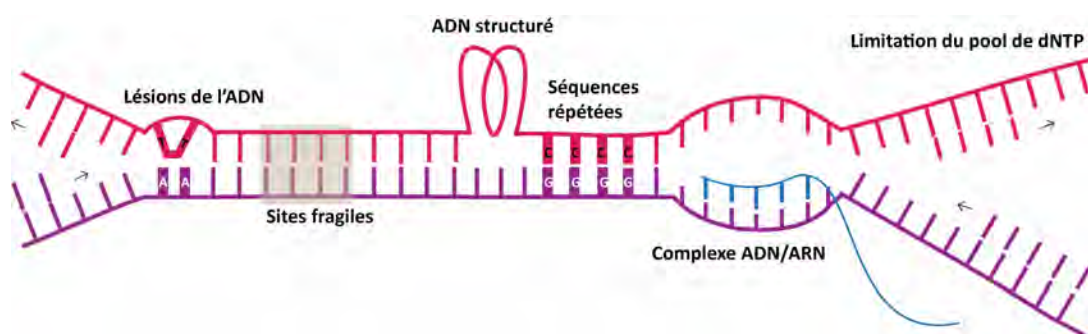


Figure 8: Différentes sources du stress réplcatif

Les barrières de fourches sont nombreuses d'origine endogène ou exogène. Elles peuvent entraîner des ralentissements de la fourche de réplication, voire un arrêt complet.
(Adapté de Zeman et cimprich, 2014)

I. Les causes du stress réplicatif

A. La dérégulation des facteurs de la réplication

De nombreux facteurs sont nécessaires pour une réplication correcte et fidèle. La variation du pool de nucléotides, des modifications des composants de la machine de réplication, ou encore des histones sont des sources du stress réplicatif (Fig 8).

Le pool de dNTPs est un facteur limitant de la réplication. La ribonucléotide diphosphate réductase (RNR) qui transforme les ribonucléotides en déoxyribonucléotides (dNTP), est la cible d'une drogue, l'hydroxy-urée (HU). La modulation du pool de dNTPs altère la dynamique de la réplication (Anglana et al., 2003) en ralentissant des fourches de réplication, et une diminution du taux d'activation des origines de réplication (Poli et al., 2012 ; Wilhelm et al., 2014). Il a été proposé que le nombre de fourches de réplication actives dépende de la quantité limitante de dNTPs pour chaque cycle cellulaire (Petermann et al., 2010). Cependant, la surexpression de la RNR protège contre le stress réplicatif. Dans des cellules sur-exprimant la RNR, après traitement provoquant des lésions sur l'ADN, le taux de progression des fourches de réplication est identique à celui de cellules sauvages non traitées (Poli et al., 2012). Il est intéressant de noter que la modulation du pool de nucléotides est retrouvée dans les étapes précoces de la tumorigenèse (Bester et al., 2011 ; Gad et al., 2014) .

Le mauvais assemblage du complexe pré-RC peut être une source de stress réplicatif. En effet, la dérégulation des protéines, cdc6, cdt1, ORC, et MCM, peut entraîner une re-réplication, et générer du stress réplicatif. Un excès d'activation des origines de réplication peut également être une source de stress réplicatif, notamment, par la consommation excessive de certains de ces facteurs, comme RPA. Le pool de RPA devient alors limitant, les nouveaux ADN simples brins générés ne peuvent pas être protégés par RPA, ce qui provoque des cassures de l'ADN ou des effondrements de fourches de réplication. Cependant, ce phénomène peut être inversé par la surexpression de RPA (Toledo et al., 2013). La dérégulation des complexes CDK/cyclines peuvent promouvoir le stress réplicatif. Le complexe CDK2/cycline E est requis pour la transition G1/S. La surexpression de la cycline E induit du stress réplicatif en dérégulant la progression du cycle cellulaire, mais aussi en

perturbant la réplication. En effet, la surexpression de la cycline E aboutit à une augmentation des origines activées. Les fourches de réplication seront ralenties à cause d'une diminution du pool de dNTPS. Ce ralentissement pourrait être à l'origine de collision avec la machinerie de transcription (Jones et al., 2013).

La réplication de l'ADN requiert une grande quantité d'histones. Les nucléosomes parentaux sont dissociés en aval de la réplication et restaurés sur les brins filles avec des nouvelles histones synthétisées (Groth et al., 2007 ; Alabert et Groth, 2012). Il a été montré que le défaut d'assemblage des nucléosomes nouvellement synthétisés entraînait un ralentissement des fourches de réplication et inhibait le déchargement de PCNA sur la chromatine (Mejlvang et al., 2014), faisant des nucléosomes un régulateur de la réplication et de la stabilité génétique. La courte privation en nucléosomes ralentit les fourches de réplication, mais n'active pas les voies de réponses aux barrières de fourches et réprime la formation d'ADN simple brin, ce qui permettrait de donner du temps à l'assemblage des nucléosomes de rattraper la réplication. Cependant, la suppression persistante des nucléosomes, peut mener à un stress réplicatif.

B. Interférence entre la réplication et la transcription

La transcription et la réplication sont deux mécanismes ayant pour matrice l'ADN. Chez les bactéries, les gènes fortement transcrits sont majoritairement transcrits dans le même sens que la réplication afin d'éviter les collisions entre les deux machineries. Chez les eucaryotes, le nombre important d'origine de réplication compliquent ce phénomène. Bien qu'il existe une ségrégation spatiale et temporelle de ces deux mécanismes (Wei et al., 1998), il arrive que la réplication et la transcription interfèrent, ce qui cause un stress réplicatif (Aguilera et García-Muse, 2013).

Il a été proposé que ce stress réplicatif puisse être dû à la présence d'hybride ADN/ARN, que l'on appelle des R-loops. Le brin d'ARN naissant peut se rehybrider, de façon inappropriée, avec le brin d'ADN matrice, générant un hybride ADN/ARN et un ADN simple brin. Ce triple brin d'acide nucléique interfère avec la réplication et cause de l'instabilité génétique (pour revue (Aguilera et García-Muse, 2012)).

Il existe des voies pour éviter la collision avec la machinerie de transcription et pour résoudre les R-loops. La convergence de la réplication et la transcription entraîne des contraintes topologiques de l'ADN, qui sont résolues par l'action des topoisomérases 1 et 2. La RNase H est capable de digérer la portion ARN d'un hybride ADN/ARN (Huertas et Aguilera, 2003) et l'hélicase Senataxine est capable de dérouler un hybride ADN/ARN (Alzu et al., 2012). La perturbation de ces systèmes augmente la probabilité de collision et de formation des R-loops, ce qui induit un blocage des ADN polymérases réplcatives et, par conséquent une augmentation de l'instabilité génétique.

Une autre voie de réponse aux R-loops a été mise à jour récemment. Il a été montré qu'un facteur appartenant la famille de la senataxine, aquarius, était requis pour la résolution des R-loops. En effet, l'extinction d'aquarius entraîne une augmentation des dommages à l'ADN, ainsi qu'une augmentation des R-Loops. Il a, également été montré, que la résolution de ces R-Loops étaient dépendante de la réparation par excision de nucléotides couplé à la transcription. En effet, la déplétion de l'endonucléase XPG, appartenant la voie du TC-NER (Transcription coupled- Nucleotide Excision Repair), entraîne une augmentation des R-Loops. Bien que cette réponse semble indépendante du blocage des fourches de réplication, Il est possible qu'elle agisse directement au niveau du R-Loop de façon coordonnée avec la réplication (Sollier et al., 2014).

Des dysfonctionnements du mécanisme d'épissage de l'ARN peuvent aussi être à l'origine de collision entre la machinerie de transcription et la machinerie de la réplication (Zeman et Cimprich, 2014).

C. La réplication des ADN non-B

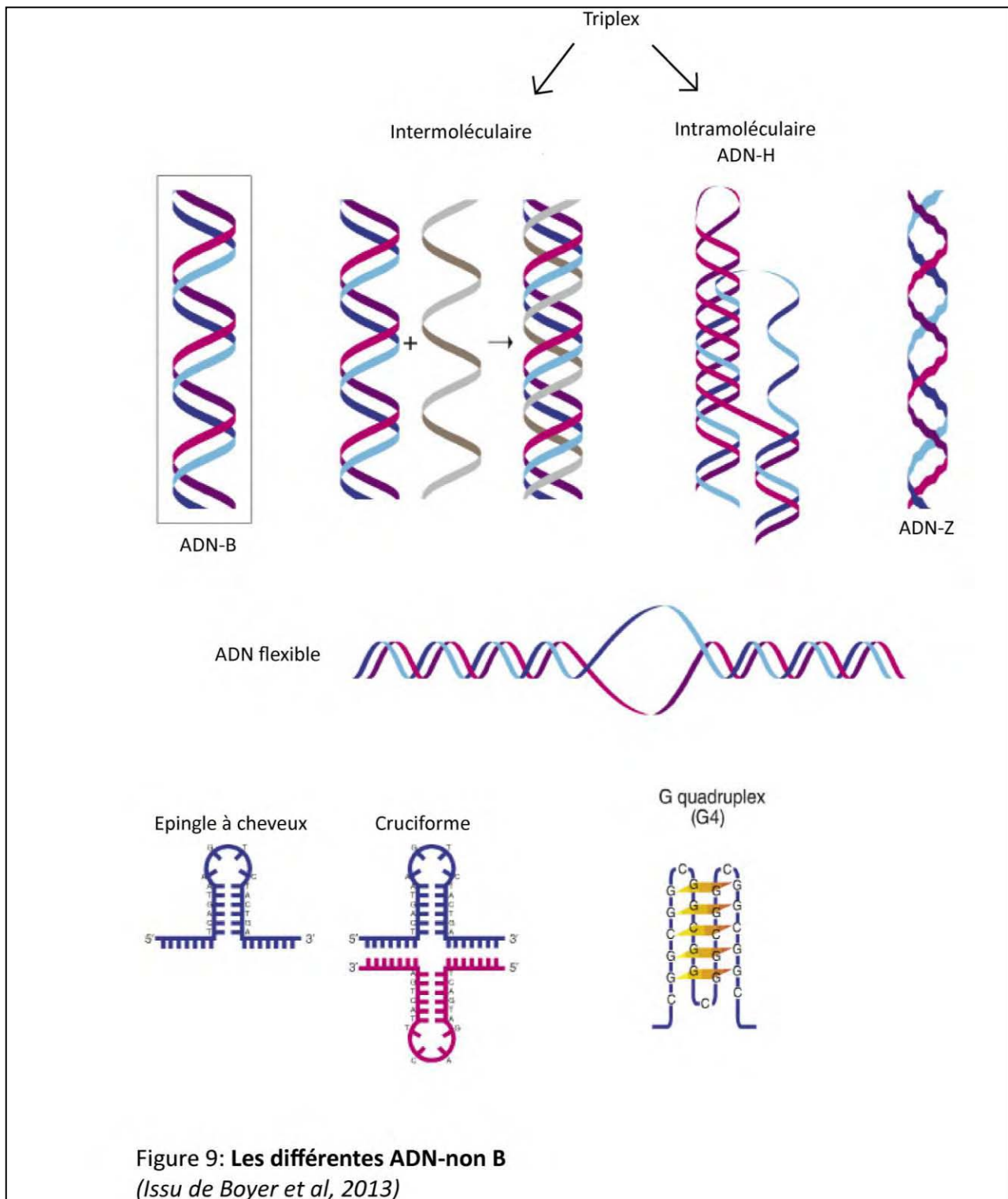
Depuis la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick en 1953, il a été démontré qu'il existait au moins 10 conformations de l'ADN, la forme majoritaire, l'ADN-B et des conformations alternatives, que l'on appelle les ADN-non B. Ces conformations ne sont pas faites au hasard, mais sont dépendantes de la séquence d'ADN. Ces ADN-non B affectent la réplication de l'ADN et par conséquent la stabilité du génome.

Les ADN-non B se forment au niveau de séquences répétées, comme les séquences répétées inversées, les répétitions en miroir, ou au niveau des répétitions directes. Les séquences répétées composent environ 50% du génome (Mirkin et Mirkin, 2007).

Les séquences inversées sont des séquences où les bases équidistantes du point de symétrie sont complémentaires. Elles forment des structures comme les épingles à cheveux sur un brin d'ADN lors de la réplication, ou un cruciforme sur les brins d'ADN complémentaires (Fig 9). Les répétitions en miroir consistent en une répétition d'homopurine sur un et homopyridine sur l'autre. Elles sont capables de former des triples hélices ou triplex. Si le troisième brin vient d'une autre hélice d'ADN, la triple hélice est dite intermoléculaire, et s'il vient de la même hélice d'ADN, la triple hélice est dite intramoléculaire, ou ADN-H (Fig 9). Les répétitions directes sont des répétitions ininterrompues du même motif. Il existe trois types de séquences répétées :

- Les répétitions d'un motif composé de 1 et 10 nucléotides sont appelées microsatellites
- Les répétitions d'un motif composé de 10 et 60 nucléotides sont appelées minisatellites
- Au-delà de 60 nucléotides, ces séquences ont pour nom ADN satellite et sont retrouvées au niveau des centromères et télomères.

En fonction des nucléotides qui composent la répétition, l'ADN adopte des conformations différentes. Les séquences riches en G sont capables de former des G4-quadruplex (G4). Ils sont composés de plusieurs plateaux parallèles reliés par des ponts hydrogène entre les guanines (Fig 9) (Zhao et al., 2010 ; Boyer et al., 2013) . Il existe aussi des séquences riches en AT, qui forme un ADN flexible.



Les fourches de réplication ont des difficultés à progresser au niveau de ces ADN-non B. Les régions les plus probables où se forment ces structures sont les télomères, les gènes ribosomiques, les sites d'initiation de la transcription, et les origines de réplication. Les fourches de réplication sont bloquées au niveau des G4, et nécessitent l'intervention

d'hélicases spécialisées pour les dérouler. Si le G4 n'est pas déroulé, la réplication sera arrêtée (Usdin et Woodford, 1995) , et entrainera de l'instabilité génétique. Par exemple, Werner est une hélicase qui intervient dans la réplication des G4 au niveau des télomères (Opresko et al., 2004). L'absence de cette hélicase provoque une maladie, le syndrome de Werner, caractérisée par un vieillissement précoce et une propension à développer des cancers méenchymateux.

Cependant, la réplication de ces séquences est un défi pour la cellule. En effet, l'efficacité de polymérisation des ADN polymérases répliquatives est fortement diminuée en présence de répétitions que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Kroutil et al., 1996 ; Tran, Gordenin, et Resnick, 1999). La fidélité de pol δ et de pol ϵ est largement diminuée lors de la réplication de séquences répétées microsatellites di-nucléotiques (Abdulovic et al., 2011). Les séquences répétées sont à l'origine de nombreuses maladies neurodégénératives, comme la maladie de Huntington, ou la dystrophie myotonique, pour laquelle on constate une expansion de triplet (Brook et al., 1992). L'instabilité des microsatellites est retrouvée également, dans des maladies, comme le syndrome de Lynch. Les patients, atteints de ce syndrome, développent une prédisposition à des cancers, suite à une mutation dans les gènes du MMR, qui provoquent d'incontrôlables insertions/délétions au niveau des microsatellites (Woerner et al., 2005).

Il existe dans le génome des séquences dites fragiles, on les appelle les sites fragiles. Il existe les sites fragiles rares présents dans 5% de la population, et les sites fragiles communs (CFS) présents chez tous les individus. Les CFS sont des séquences sujettes aux cassures et aux réarrangements, à cause de la grande flexibilité de leur séquence riche en AT. Mais, leur capacité à former des ADN structurés est encore inconnue (Debatisse et al., 2012). La réplication au travers de ces séquences est très perturbée. Il y a deux aspects à prendre en compte : l'appauvrissement en origines de réplication et la progression des fourches de réplication. L'appauvrissement en origine oblige la fourche de réplication à parcourir une distance plus grande, augmentant la probabilité de rencontrer des structures secondaires, ou autres dommages sur l'ADN. Les CFS sont également des sites de pause des ADN polymérases (Boyer et al., 2013).

D. Les lésions de l'ADN

Une des causes principales du stress répliatif est la persistance de lésions qui bloquent l'avancée des ADN polymérases répliatives.

Les lésions oxydatives sont dues à la production d'espèces réactives oxygénées (ROS). La mitochondrie est la source majeure de ROS due à la consommation d'oxygène, dans la chaîne respiratoire. Les ROS peuvent également avoir d'autres sources endogènes, comme les réactions inflammatoires, le métabolisme du peroxyosome ou le métabolisme du cytochrome p450 (pour revue Zhou, Shao, et Spitz, 2014). De façon exogène, les ROS peuvent être produits par les radiations (Girard et al., 2008). Dans des conditions normales, la production de ROS est contrebalancée par la production d'anti-oxydant. On parle de stress oxydatif quand la balance oxydant/anti-oxydant est dérégulée, au profit de la production de ROS. Cette dérégulation entraîne l'oxydation de l'ADN, des dNTPs libres, de l'ARN, des protéines et des lipides. L'oxydation des lipides, par exemple, forment des liaisons inter-brins ce qui bloque l'avancée des polymérases répliatives.

La protéine MTH1 est une protéine connue pour convertir les dNTPs oxydés en dNTPs non oxydés. Elle est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers, ce qui contribue à la survie des cellules cancéreuses, en leur permettant d'incorporer des dNTPs non oxydés. Il a été montré que des inhibiteurs de MTH1 provoquaient un stress répliatif, à cause de l'incorporation de dNTPs oxydés durant la répliation. Les inhibiteurs de MTH1 ont été utilisés pour induire des dommages à l'ADN et induire l'apoptose de cellules (Gad et al., 2014).

Les radiations dues aux UV-B ont un rôle prépondérant dans le cancer de la peau. Ils vont induire des photoproduits, les dimères de pyrimidines (TT, TC, CC ou CT), qui vont bloquer l'avancée des fourches de répliation.

Les radiations ionisantes interagissent directement avec l'ADN et forment des cassures simples ou doubles brins (Tableau 2). Cependant, ces radiations peuvent aussi avoir un effet indirect, par l'ionisation des molécules d'eau, formant des radicaux libre oxygénés, qui vont générer des cassures simple ou doubles brins sur l'ADN.

Des agents chimiques peuvent également induire des dommages sur l'ADN. Par exemple, les hydrocarbures polycycliques comme le benzo[a]pyrène, présents dans la fumée de cigarette, réagissent avec l'ADN et engendrent des adduits de grandes tailles sur des guanines. Dans le cadre de traitement par chimiothérapie, le cisplatine est utilisé, et crée des liaisons inter et intra-brin avec l'ADN (Tableau 2).

Origines de l'agent	Exemples	Type de dommages
Environnement	Radiations ionisantes UV Hydrocarbures polycycliques (benzopyrène)	Cassures simple/double brin Ponts inter/intra-brins Adduits de grandes tailles sur l'ADN
Chimiothérapie	Cisplatine Mitomycine C	Ponts inter/intra-brins Mono-adduits, ponts inter/intra-brins, et cassures simple brins
Agents alkylants	cyclophosphamide	Mono-adduit, ponts inter-brins

Tableau 2 : **Exemple de dommages induits par des agents exogènes**

II. Les conséquences du stress répliatif

Des perturbations durant la réplication de l'ADN engendrent du stress répliatif. La première conséquence est l'activation du point de contrôle de phase S, qui va permettre la stabilisation et le redémarrage des fourches de réplication. Parfois, la fourche de réplication ne redémarre pas si les dommages persistent, ce qui a des conséquences sur les autres phases du cycle cellulaire, notamment en mitose. En effet, des régions du génome incomplètement répliquées peuvent se retrouver en mitose, conduire à la formation de ponts anaphasiques et à des défauts de ségrégation des chromosomes (Fig 10). Il en existe deux sortes de ponts anaphasiques: les ponts détectés par des intercalants de l'ADN comme

le DAPI, et les ponts détectés à l'aide de RPA, les ponts anaphasiques ultra-fins. Les ponts anaphasiques ultra-fins sont retrouvés au niveau des sites fragiles communs, des centromères et de télomères (Liu et al., 2014). D'ailleurs, l'induction de cassures par Mus81-Eme1, ERCC1, et SLX4 au niveau des CFS prévient la formation de ponts anaphasiques ultra-fins (Naim et al., 2013 ; Guervilly et al., 2015). Les protéines appartenant à la voie de l'anémie de Fanconi participent à la résolution de ces ponts anaphasiques (Naim et Rosselli, 2009). La non résolution des ponts anaphasiques peut entraîner des cassures de l'ADN et la formation de micro-noyaux en fin de mitose. Les micro-noyaux sont des corps extranucléaires, résultant d'une ségrégation asymétrique des chromosomes enveloppés par leur propre enveloppe nucléaire. L'augmentation du nombre de micro-noyaux est observée quand les ponts anaphasiques ne sont pas résolus et ils peuvent persister durant plusieurs cycles cellulaires. Il est proposé que les micro-noyaux soient à l'origine des chromothripsis, un phénomène où des milliers de gènes sont réarrangés durant un cycle cellulaire et dans une région donnée, il est retrouvé dans des cancers et des maladies congénitales.

Deux études récentes ont montré que les cassures issues de la non-résolution des ponts anaphasiques sont transmises aux cellules filles, et sont séquestrées en G1 dans de gros foyers contenant par la protéine 53BP1, un suppresseur de tumeur, et des protéines de dommages à l'ADN comme γ H2AX, ou des facteurs de la réparation, ce qui fait des foyers 53BP1 un témoin de l'instabilité génétique. Il est à noter que la quantité de foyers 53BP1 augmente après induction d'un stress réplicatif (Lukas et al., 2011 ; Harrigan et al., 2011)

L'instabilité chromosomique (CIN) est retrouvée dans certains cancers solides. Une étude montre que les cancers CIN+ sont associés à la présence de cassures double brins (signalées par la phosphorylation de l'histone H2AX), à l'augmentation des foyers 53BP1, et à l'augmentation de ponts anaphasiques ultra-fins. Ils ont également montré que l'induction de stress dans une lignée cellulaire issue de cancers CIN- entraînait la présence de ponts ultra-fins, et de chromosomes dicentriques. Par des expériences d'hybridation génomique comparative, ils ont pu voir que 80% des cancers CIN+ perdaient l'hétérozygotie du chromosome 18q, qui code pour des gènes répresseurs de stress réplicatif (Burrell et al., 2013), ce qui provoque l'apparition d'instabilité chromosomique dans les cancers. Ces travaux mettent en évidence que le stress réplicatif est une cause des CIN.

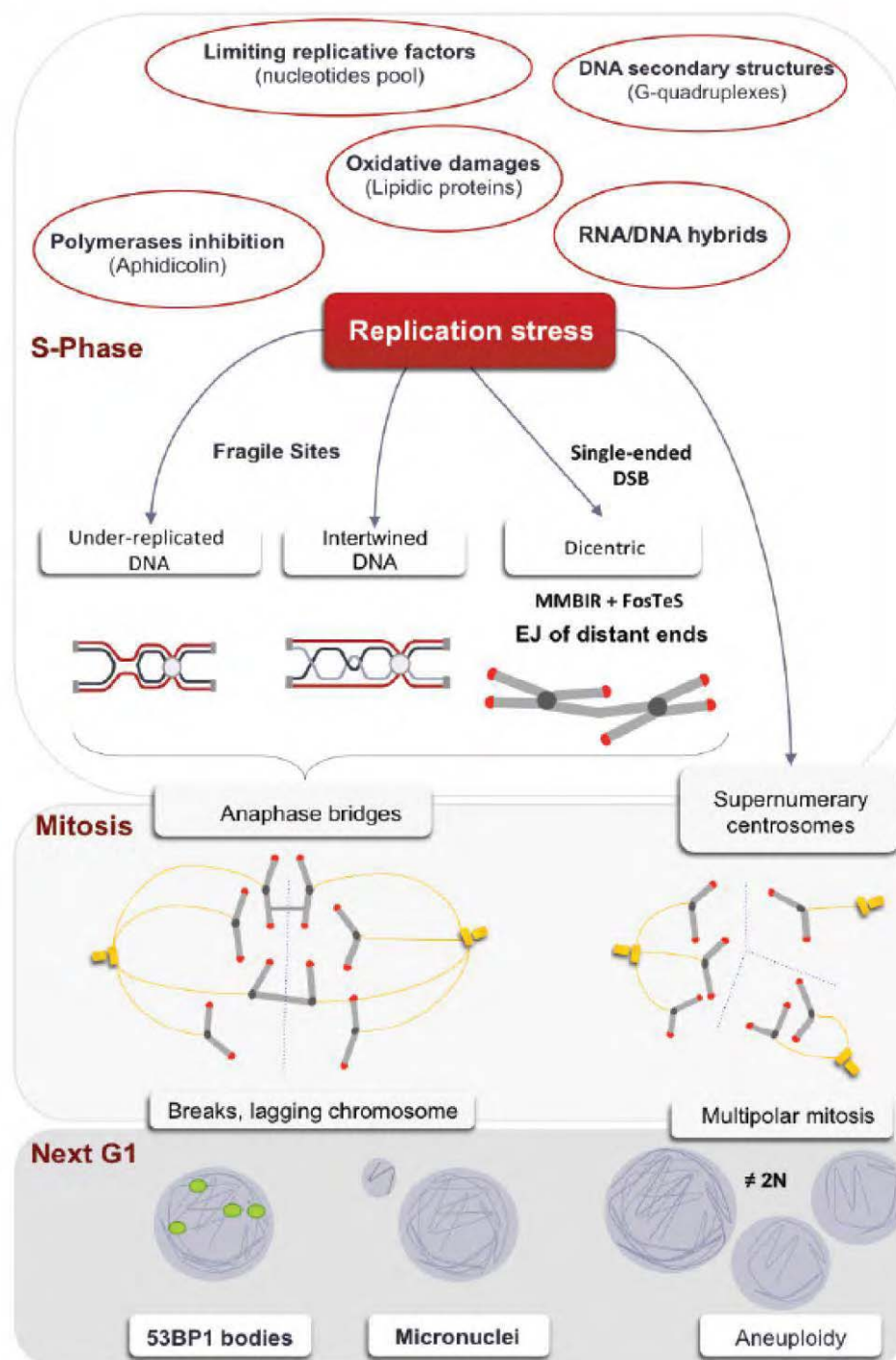


Figure 10 : Le stress réplicatif et ses conséquences

Le stress réplicatif de nature endogène ou exogène peut mener à la persistance de régions d'ADN mal répliquées ou mal décaténées, provoquant la formation de ponts anaphasiques au moment de la ségrégation des chromosomes. Ces ponts ou les cassures générées seront pris en charge par les foyers 53BP1, ou aboutiront à la formation de micro-noyaux, ou à de l'aneuploïdie.

(Adapté de Gelot et al, 2015)

Les tissus pré-cancéreux, nommés tissus hyperplasiques et tissus dysplasiques, évoluent en tissu cancéreux. Les stades pré-cancéreux se distinguent par une hyperprolifération des cellules cancéreuses. Une accumulation de cassures doubles brins ont été trouvées dans ces tissus précancéreux, signalées par la phosphorylation de H2AX, et par l'activation de protéines de réponses aux cassures doubles brins comme Chk2, ATM ou p53 (Gorgoulis et al., 2005). La protéine p53 est retrouvée dérégulée dans un grand nombre de cancers. Cette dérégulation permet aux cellules cancéreuses de contourner les voies de réponses aux dommages à l'ADN, et ainsi continuer leur prolifération. Ces manifestations d'instabilité génétique ont lieu dans des cellules hyperprolifératives, où le génome est dupliqué intensément. Le modèle propose que la surexpression de la cycline E entraîne la génération de stress réplicatif, et provoque des cassures doubles brins, entraînant, à son tour, une perte d'hétérozygotie en sélectionnant la perte ou la mutation de p53, ou d'autres protéines intervenant dans la réponse aux dommages (Fig 11) (Bartkova et al., 2005). Le stress réplicatif serait donc antérieur à la perte ou la mutation de p53 dans les étapes précoces de la cancérogénèse.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les cellules progénitrices des cellules sanguines. Leur activité décline au cours du temps et la production du sang s'en trouve perturbée. Les raisons pour lesquelles la fonction des CSH décline avec l'âge sont encore inconnues. Cependant, les CSH humaines et murines accumulent du signal γ H2AX avec l'âge, suggérant que le déclin de l'activité pourrait être dû au stress réplicatif. Flach et collaborateurs ont montré qu'effectivement les CSH âgées accumulaient γ H2AX, sans que les voies de réponses aux dommages à l'ADN ne soient altérées. Dans ces mêmes cellules, ils ont observé une accumulation de RPA et d'ATRIP (protéine du point de contrôle de phase S décrit dans la partie II), suggérant que le signal γ H2AX pourrait venir d'un stress réplicatif. En comparant l'expression des gènes entre les CSH âgées et les progéniteurs de macrophages, ils ont observé une dérégulation négative de tous les gènes MCM, laissant penser que la mise en place d'origines de réplication non fonctionnelles dans les CSH âgées générerait du stress réplicatif. De façon intéressante, des CSH jeunes traitées pendant 36h avec de l'aphidicoline, un inhibiteur des ADN polymérases répliquatives, et greffées sur des souris montrent un défaut de reconstitution de moelle osseuse, et le nombre de cellules greffées est significativement réduit au même niveau que les CSH âgées traitées ou non. Les CSH

jeunes ayant subies un stress réplcatif voient leur activité sérieusement impactée de façon équivalente à des CSH âgées. Le stress réplcatif, dû au déficit de MCM, pourrait donc être le moteur du déclin des CSH au cours du temps (Flach et al., 2014) .

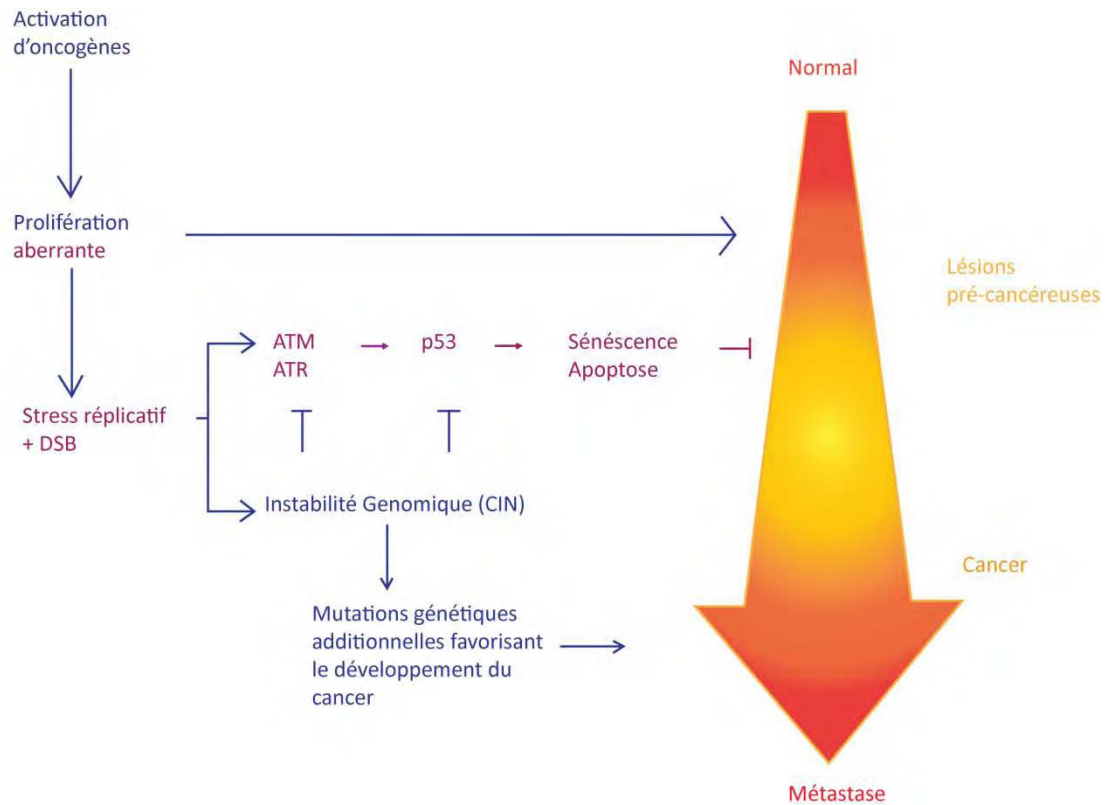


Figure 11: **Modèle de tumorigénèse induite par le stress réplcatif**

L'activation d'oncogène peut aboutir à la prolifération aberrante des cellules et à un stress réplcatif. Ce stress génère des cassures doubles brins, qui activent les voies de réponses aux dommages en bloquant la progression tumorale par une sénescence réplcatrice. Le stress réplcatif induit une instabilité génomique, qui favorise la progression tumorale, par perte d'hétérozygotie des loci des gènes suppresseurs des tumeurs.

(Adapté de Halazonetis, et al 2008)

Chapitre III : Les réponses cellulaires au stress réplcatif

La réplication de l'ADN est une étape cruciale nécessitant une surveillance accrue. Comme nous avons pu le voir, la réplication de l'ADN est fréquemment ralentie ou stoppée par la présence de barrière de fourche, générant du stress réplcatif. La cellule a mis en place des réponses à ces blocages de fourches. Parmi les différentes réponses, nous nous concentrerons plus particulièrement, sur l'activation de la voie ATR/Chk1, ainsi que sur les mécanismes de tolérance des dommages.

I. Activation du checkpoint de phase S

Le stress réplcatif qui résulte d'un ralentissement ou d'un blocage des fourches de réplication se traduit par l'apparition de longues séquences d'ADN simple brin (ADNsb) dû par exemple au découplage entre les ADN polymérases de la fourche et le complexe hélicase MCM. Il s'ensuit l'activation d'une voie de signalisation, la voie ATR/Chk1 (Checkpoint de phase S), un garant de la stabilité génétique (Zhou et Elledge, 2000) (Fig 12). En effet, son activation va permettre la stabilisation du réplisome, la réparation, et le redémarrage des fourches bloquées (Nam et Cortez, 2011) . L'activation de la voie nécessite un enchainement d'évènement complexe et fait intervenir un grand nombre de protéines. Son inactivation entraîne un effondrement des fourches de réplication, la formation de cassures double brin de l'ADN et de l'instabilité génétique qui favorise la progression tumorale.

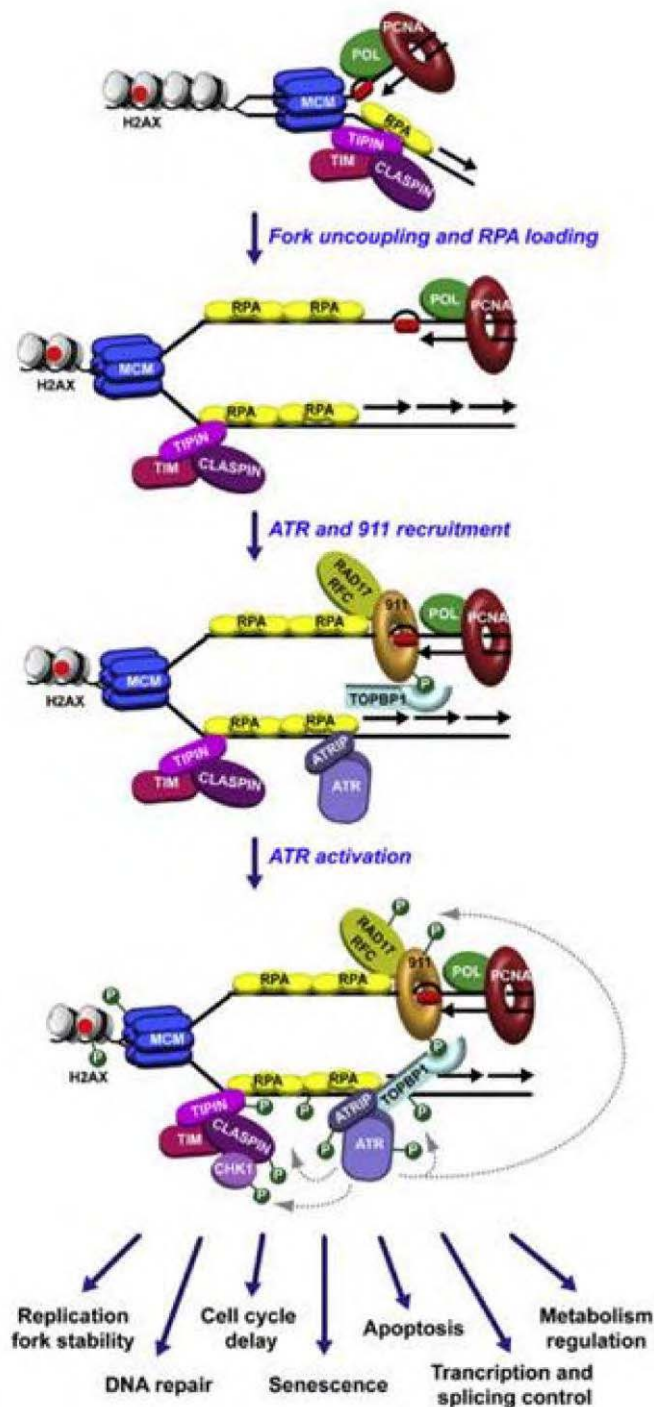


Figure 12: L'activation de la voie ATR/Chk1

Le blocage de la fourche de réplication suite à une barrière de fourche endogène ou exogène, aboutit à un découplage entre les hélicases et les polymérases, générant de l'ADNsb. Cet ADNsb est recouvert par la protéine RPA. Il y a ensuite recrutement du complexe ATR/ATRIP à la chromatine. Le complexe 9-1-1/ TopBP1 sont à leur tour chargés sur la fourche bloquée. Les protéines Timeless, Tipin et Claspine sont aussi nécessaires pour la pleine activation d'ATR, qui aboutit à la phosphorylation de Chk1. L'activation de la voie ATR/CHK1 va permettre notamment la stabilisation de la fourche bloquée, l'arrêt du cycle cellulaire, et le redémarrage des fourches. Adapté de (Ciccio et Elledge, 2010)

A. L'activation d'ATR aux fourches bloquées

L'activation de la voie ATR/Chk1 passe par l'activation d'ATR (ATM et Rad3 related), la kinase majeure de la voie. ATR est une kinase appartenant à la famille des phosphoinoside 3 Kinase (PI3K), et porte une activité sérine/thréonine kinase. Par son rôle durant la phase S, ATR est une kinase essentielle, d'ailleurs les souris ATR « knock out » (KO) présente une létalité embryonnaire (Brown et Baltimore, 2000). Il a été observé que des mutations hétérozygotes ou hypomorphiques dans le gène d'ATR étaient à l'origine d'une maladie, le syndrome de Seckel, caractérisé par un retard mental et une microcéphalie (O'Driscoll et al., 2003). Un modèle de souris reproduisant ce syndrome (souris ATR^{ss}) récapitule les symptômes humains et les auteurs suggèrent que l'origine de ce phénotype serait due à un stress réplicatif embryonnaire accru (Murga et al., 2009).

1. Le complexe ATR/ATRIP/ADNsb

L'activation d'ATR dans le checkpoint de phase S passe par son recrutement sur l'ADNsb, via son interaction avec son co-facteur ATRIP (ATR Interacting Protein) et RPA (Costanzo et al., 2004 ; Zou, Liu, et Elledge, 2011). L'association entre ATR et ATRIP est requise, mais n'est pas régulée. Il a été montré qu'ATRIP se lie avec l'ADNsb, et permet le recrutement d'ATR au niveau des fourches bloquées (Ball, 2005). ATR et ATRIP co-localisent avec les foyers de dommages de l'ADN. La déplétion de RPA par siARN empêche la formation de ces foyers (Dart et al., 2004). Cependant, il a récemment été montré, dans extraits d'œufs de Xénope, que le recrutement en excès de RPA est dispensable pour l'activation de la voie ATR/Chk1, mais que la présence d'ADNsb est indispensable pour l'activation du checkpoint de phase S (Recolin, Van der Laan, et Maiorano, 2012). Ces résultats sont concomitants avec une étude réalisée dans des cellules humaines, où la déplétion de RPA par siRNA n'a pas d'impact sur l'activation du checkpoint (Dodson, Shi, et Tibbetts, 2004). De plus, l'expression dans les cellules d'un mutant d'ATRIP qui empêche l'interaction avec RPA n'altère pas l'activation de la voie ATR/Chk1 (Ball, 2005). Ces observations suggèrent qu'il existerait d'autres protéines de liaison à l'ADN encore méconnues, et qui permettraient de protéger l'ADNsb.

Trois médiateurs additionnels interviennent dans la signalisation du checkpoint de phase S, Timeless, son co-facteur Tipin (Timeless-Interacting Protein), et claspine (Unsal-Kaçmaz et al., 2005). Il a été montré que ce complexe est nécessaire pour la phosphorylation de Chk1 par ATR, en réponse aux UV, et au traitement par l'Hydroxyurée (Yoshizawa-Sugata et Masai, 2007 ; Unsal-Kaçmaz et al., 2007). Le complexe timeless/Tipin s'associe avec RPA, via Tipin, ce qui permet la stabilisation de claspine, et la pleine phosphorylation de Chk1 par ATR (Kemp et al., 2010).

2. L'hétérotrimère 9-1-1 et TopBP1

L'interaction entre ATR, ATRIP et l'ADNsb est requise pour l'activation d'ATR, mais elle n'est pas suffisante. Elle nécessite le recrutement indépendant du complexe 9-1-1, composé des protéines Rad9-Hus1-Rad1. Cet hétérotrimère possède une structure comparable à celle de PCNA. Il est chargé à la chromatine de la même manière que PCNA, grâce à un complexe RFC alternatif où la plus large sous-unité RFC1 est remplacée par Rad17 (Ellison et Stillman, 2003 ; Bermudez et al., 2003). Une étude récente portant sur la queue C-terminale (C-tail) de Rad9 montre que sa délétion augmente le recrutement du 9-1-1 à la chromatine, indépendamment de Rad17. De plus, ils mettent en évidence 15 acides aminés requis pour l'interaction entre la C-tail de Rad9 et la structure du 9-1-1 (CRS Core Ring Structure). Les auteurs de cette étude proposent que la C-Tail permette de masquer un site intrinsèque de liaison à l'ADN (Takeishi et al., 2015)

L'activation d'ATR nécessite une synthèse d'ADN au niveau des fourches bloquées. En effet, il avait été montré qu'une synthèse d'amorce d'ARN par pol Alpha était requise pour une pleine activation du checkpoint de phase S (Michael, 2000). Plus récemment, par des expériences de réplication *in vitro* dans des extraits d'œufs de Xénope après traitement avec des faibles doses d'aphidicoline (drogue qui inhibe les ADN polymérases répliquatives mais qui, à faible dose, les ralentit et permet d'activer le checkpoint sans induire de dommages), une accumulation d'ADN naissants a été observée. Le complexe 9-1-1 se lie à l'ADN en 5' de la jonction ADN simple brin/ADN double brin (Ellison et Stillman, 2003). De plus, l'inhibition de pol Delta entraîne une diminution de cette synthèse et un défaut d'activation du checkpoint (Van et al., 2010). Nous montrons dans la partie résultat que la polymérase spécialisée pol Kappa est aussi requise pour la synthèse de brins naissants nécessaires au recrutement du

complexe 9-1-1 et donc à l'activation de Chk1 (Bétous et al., 2013). Ce papier sera discuté et détaillé dans la partie « résultats ».

L'activation d'ATR nécessite le chargement de la protéine TopBP1 (Topoisomérase Binding Protein I) (Hashimoto et al., 2006 ; Parrilla-Castellar et Karnitz, 2003). Cette protéine interagit avec la C-Tail phosphorylée sur la sérine 387 de Rad9, qui crée un site de reconnaissance pour les domaines BRCT (BRCA1 C Terminus) I et II de TopBP1 en N-terminal (Delacroix et al., 2007). TopBP1 possède un domaine activateur d'ATR situé dans entre ces domaines BRCT VI et VII en C-terminal, qui permet son interaction *in vitro* avec le complexe ATRIP/ATR (Kumagai et al., 2005). La surexpression de ce domaine conduit à l'activation d'ATR, et la fusion de ce domaine avec PCNA ou H2B s'affranchit de Rad17 ou du 9-1-1 pour l'activation d'ATR (Delacroix et al., 2007). Le site de liaison de TopBP1 sur le complexe ATR/ATRIP est porté par ATRIP et la mutation de ce site bloque l'activation du complexe. L'activation du complexe ATR/ATRIP requiert un domaine porté par ATR, le domaine PRD (PIKK Interacting Domain) dont la mutation n'affecte pas l'activité basale d'ATR, mais prévient son activation par TopBP1, ce qui conduit à des défauts similaires à ceux induits par la perte complète d'ATR (Mordes et al., 2008).

Récemment, une nouvelle protéine interagissant avec le 9-1-1 et TopBP1 a été mise à jour. Dans des cellules U2OS (cellules ostéosarcomes humaines), les auteurs ont déplété des protéines par siRNA et réalisé une étude à grande échelle basée sur la microscopie. Après transfection des cellules, ils les ont traitées par irradiation (10Gy) et analysé l'entrée des cellules mitose 18h après traitement. Grâce à cette étude, ils ont pu mettre en évidence une nouvelle protéine RHINO (Rad9-Rad1 Hus1 Interacting Nuclear Orphan) (Cotta-Ramusino et al., 2011). La déplétion de RHINO sensibilise les cellules aux traitements par irradiations, camptothécine (drogue qui lie la topoisomérase I avec l'ADN de façon irréversible), et aux MMS (Lindsey-Boltz et al., 2015). Une étude par spectrométrie de masse, confirmée ensuite par immunoprécipitation montre une interaction entre RHINO et le complexe 9-1-1. La relocalisation de RHINO sous forme de foyer après irradiation dépend de la présence du complexe 9-1-1 (Cotta-Ramusino et al., 2011). Il a également été montré, par immunoprécipitation l'interaction entre TopBP1 et RHINO sous stress réplcatif (Cotta-Ramusino et al., 2011 ; Lindsey-Boltz et al., 2015). Cependant, l'absence de RHINO n'empêche pas l'interaction entre TopBP1 et le complexe 9-1-1, les auteurs suggèrent que

RHINO n'est pas indispensable à l'activation du checkpoint, et qu'en son absence une autre protéine puisse prendre sa place (Lindsey-Boltz et al., 2015).

B. Chk1 : effecteur du checkpoint de phase S

Chk1, une sérine-thréonine kinase, est le principal effecteur du checkpoint de phase S. Cette protéine régule la progression de la phase S en présence ou non de stress répliatif, via ces différentes fonctions, dans la régulation de l'initiation de la réplication, la tolérance des lésions, la signalisation de l'apoptose, ou en mitose.

Tout comme ATR, sa délétion induit une létalité embryonnaire précoce (Liu et al., 2000). Par ailleurs, les cellules épithéliales mammaires de souris hétérozygotes pour Chk1 passent en mitose avant que tout le génome ne soit répliqué et présentent une forte instabilité génétique (Lam et al., 2004)

1. La localisation de Chk1

Chk1 fait constamment la navette entre le cytoplasme et le noyau, même si elle est majoritairement nucléaire. Le domaine C-terminal de Chk1 est requis pour son import/export nucléaire. Deux motifs très conservés, CM1 et CM2, ont été montré comme étant les motifs d'export nucléaire (NES : Nuclear Export Signal) et de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localisation Sequence) respectivement. La mutation ponctuelle du domaine CM1 entraîne une accumulation nucléaire de Chk1. L'export nucléaire de Chk1 serait dépendant de crm1 (Chromosomal Maintenance 1), une protéine d'export nucléaire qui lie les séquences NES riches en leucine (Wang et al., 2012) .

Il a également été montré que la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280 entraînait sa relocalisation dans le noyau. Cette phosphorylation, requise pour activation efficace de Chk1 après irradiations par les UV, est réalisée par la kinase 90kDa ribosomale S6 kinase (p90RSK). L'accumulation de Chk1 dans le noyau précède son activation par ATR (Li et al., 2012) .

Chk1 est phosphorylé par ATR sur les sérines 345 et 317. La phosphorylation de Chk1 sur la serine 345 est essentielle pour la signalisation du checkpoint de phase S. La phosphorylation de la sérine 317 semble être un pré-requis pour la phosphorylation de la serine 345. La phosphorylation de Chk1 par ATR rend compte de son activation (Walker et al., 2009) . Cependant, ATR a peu d'affinité pour la protéine Chk1 seule. Après stress réplcatif, la protéine claspine est phosphorylée dans le domaine de liaison à Chk1 par la caséine kinase 1 γ 1, ce qui permet l'interaction entre claspine et Chk1. Cette association promeut la phosphorylation de Chk1 par ATR, et par conséquent son activité. D'ailleurs l'absence de claspine entraîne un défaut de phosphorylation de Chk1, et par conséquent un checkpoint inactif (Mailand et al., 2006 ; Kumagai et Dunphy, 2000). 20% du pool de Chk1 total est lié à la chromatine mais la phosphorylation des sérines 317 et 345 par ATR entraîne une dissociation entre Chk1 et la chromatine, son relargage dans le nucléoplasme où elle s'auto-phosphoryle sur la serine 296, il s'ensuit alors la déphosphorylation des sérines 317 et 345. Cette phosphorylation sur la sérine 296 est reconnue par l'isoforme γ de la protéine 14-3-3, protéine participant à la voie de régulation de la progression du cycle cellulaire et au checkpoint de dommages à l'ADN. Cette liaison entre Chk1 et γ 14-3-3 est requise pour l'inactivation de cdk2, ce qui permet l'arrêt du cycle cellulaire (Kasahara et al., 2010).

Il a également été montré que Chk1 pouvait être recruté au niveau des sites de dommages grâce à sa PARylation (Poly(ADP)-ribosylation. Cette modification post-traductionnelle est catalysée par la famille des PARP. En effet, PARP1 est capable d'ajouter une longue chaîne de PAR à Chk1, qui sera recruté aux sites de dommages indépendamment de claspine ou ATR (Min et al., 2013).

2. Les fonctions de Chk1

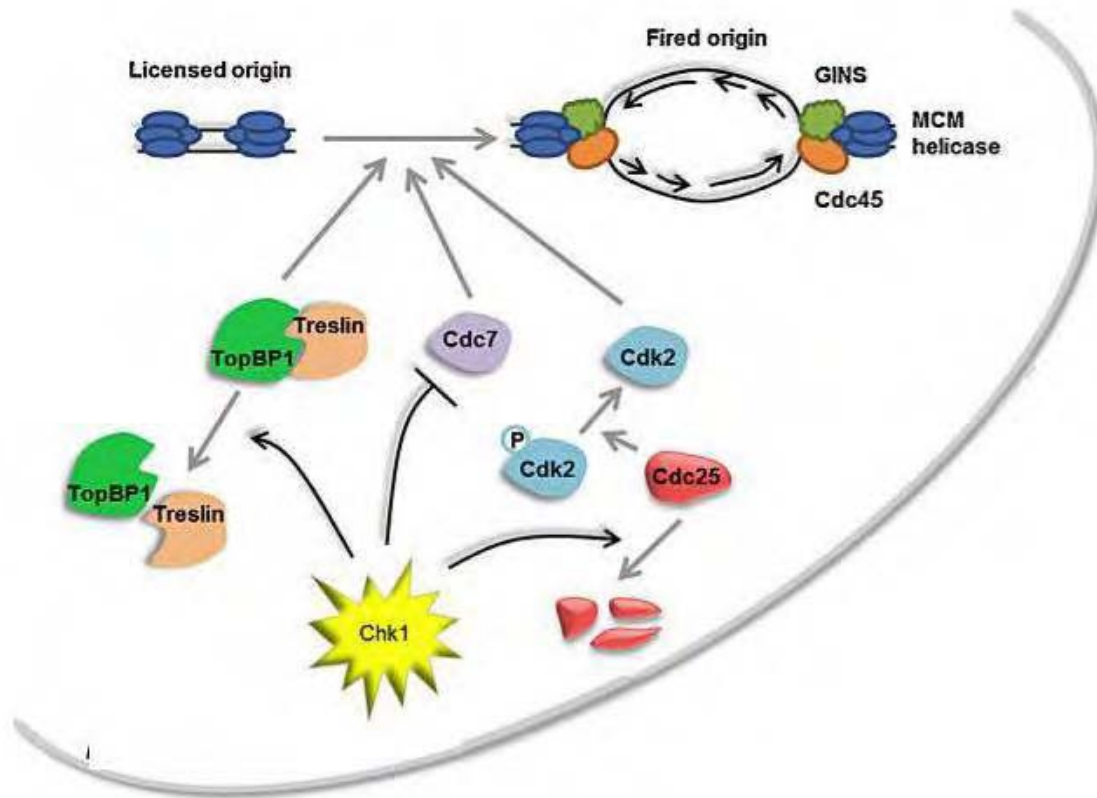


Figure 13 : Chk1 et la réplication de l'ADN

Chk1 inhibe les origines de réplication en empêchant le chargement de cdc45 sur la chromatine. Après stress réplcatif, Chk1 prévient l'activation de cdk2, mais aussi inactive cdc7. Chk1 empêche l'interaction entre topBP1 et treslin, ce qui aboutit au non chargement du complexe CMG au niveau des origines de réplication. Adapté de (González Besteiro et Gottifredi, 2015).

a) Régulation des origines de réplication

Après stress réplcatif, Chk1 a pour rôle de signaler l'arrêt des fourches à l'ensemble du noyau. Pour cela, elle phosphoryle différents substrats (Blasius et al., 2011). Les cibles clés de Chk1 sont les phosphatases cdc25 (A, B, et C) (Sanchez et al., 1997 (Fig13)). Leur